

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1962

N° _____

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLOME D'ÉTAT)

551

PAR

EINSWEILER Jean

Né le 21 Janvier 1934 à MERLEBACH (Moselle)

Présentée et soutenue publiquement le :

1962

L'UTILISATION DES POLYETHYLENE GLYCOLS POUR LES INCLUSIONS
DE PIÈCES HISTOLOGIQUES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE — CONDITIONS D'EMPLOI

Président : M. Jean VERNE Professeur

Année 1962

n°.....

T H E S E
pour le
D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplome d'Etat)

PAR

E I N S W E I L E R J E A N

Né le 21 janvier 1934 à MERLEBACH (Moselle)

Présentée et soutenue publiquement le1962

L'UTILISATION DES POLYETHYLENE GLYCOLS POUR LES INCLUSIONS
DE PIECES HISTOLOGIQUES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE - CONDITIONS D'EMPLOI.

Président: M. Jean VERNE, Professeur



PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Aubin (A), Bénard (H), Bulliard (H), Cadenat (F), Chabrol (E), Champy (C), Debré (R.), Gastinel (P.), Guillain (G.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Levy-Solal (E.), Lian (C.), Loeper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis, Richet (C.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSEESSEUR Jean VERNE

I - PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	Delmas (A.)
Anatomie pathologique	Delarue (J.)
Anesthésiologie	Baumann (J.)
Biochimie médicale	Jayle (M.F.)
" " (Prof ^r à titre personnel)	Ettori (J.)
" " (Prof ^r à titre personnel)	Schapira (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux sports	Chailley-Bert (P.)
Biologie médicale	Fauvert (R.)
" " (Prof ^r à titre personnel)	Bourlière (F.)
Cancérologie médicale et sociale	Bernard (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	Redon (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	Mouquin (M.)
(Beaujon)	Sicard (A.)
(Cochin)	Léger (L.)
(Hôtel-Dieu)	Patel (J.)
Cliniques chirurgicales (Pitié)	Cordier (G.)
(Saint Antoine)	Gosset (J.)
(Salpetrière)	N.
(Tenon)	Lortat-Jacob (J.L)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades) ..	Fèvre (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	Merle d'Aubigné (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais) ..	Gaudart-d'Allaines (F.de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec)	Mathey (J.)

Clinique endocrinologique (Pitié) Decourt (J.)
 Clinique de génétique
 médicale (Enfants-Malades) Lamy (M.)
 Clinique gynécologique (Broca) Funck-Brentano (P.)
 Clinique des maladies cutanées
 et syphilitiques (St Louis) Degos (R.)
 Clinique des maladies des
 enfants (Enfants-Malades) Cathala (J.)
 Clinique des maladies
 infectieuses (Claude Bernard) .. Mollaret (P.)
 Clinique des maladies mentales et
 de l'encéphale (Ste Anne) Delay (J.)
 Clinique des maladies
 métaboliques (Necker) Hamburger (J.)
 Clinique des maladies du
 sang (Broussais) Marchal (G.)
 Clinique des maladies du système
 nerveux (Salpêtrière) N.
 { Boucicaut Lenègre (J.)
 { Broussais Soulié (P.)
 { Cochin Justin-Besançon (E.)
 cliniques médicales { Cochin Brouet (G.)
 { Hôtel-Dieu Bariety (M.)
 { Pitié Dreyfus (G.)
 { St Antoine Kourilsky (R.)
 Clinique médicale d'hydrologie et
 climatologie (Bichat) Debray (C.)
 Clinique médicale
 propédeutique (Broussais) Gennes (L.de)
 Clinique medico-sociale du diabète sucré
 et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu) Derot (M.)
 Clinique de neuro-chirurgie (Pitié) David (H.)
 Clinique neurologique (Salpêtrière) Garcin (R.)
 { Baudelocque) ... Lacomme (M.)
 Cliniques obstétricales (Foch Suresnes.. Mergier (R.)
 Clinique obstétricale et
 gynécologique (Port Royal) Varangot (J.)
 Clinique ophtalmologique (Hôtel Dieu)... Renard (G.)
 Clinique oto-rhino-
 laryngologique (Lariboisière)... Aubry (M.)
 Clinique de pédiatrie et de
 puériculture (St Vincent de Paul) Lelong (M.)
 Clinique de pédiatrie Sociale (Enfants-Malades) Marie (J.)
 Clinique de pneumo-phtisiologie (L'Hennec) Bernard (E.)
 Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière) Michaux (L.)
 Clinique de rhumatologie médicale
 et sociale (Cochin) Coste (F.)
 Clinique stomatologique (Pitié) Dechaume (M.)
 Clinique thérapeutique
 chirurgicale (Vaugirard) N.
 Clinique thérapeutique
 médicale (St Antoine) Lemaire (A.)
 Clinique urologique (Cochin) N.

Embryologie.....	Giroud (.)
" (Profr à titre personnel)...	Tuchmann-Duplessis (H.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière).....	Sèze (.de)
Histologie	Verne (J.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau).....	Turpin (R.)
Hygiène et médecine préventive	Joannon (P.)
" (Profr à titre personnel).....	Deparis (M.)
Médecine du Travail	Desoille (H.)
Médecine légale	Fiedelièvre (R.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie).....	Fasquelle (R.)
Parasitologie	Galliard (H.)
" (Profr à titre personnel).....	Brumpt (L.C.)
Pathologie chirurgicale	Couveiaire (R.)
" " (Profr à titre personnel).....	Laurence (G.)
Pathologie exotique	Lavier (C.)
Pathologie expérimentale et comparée	Merklen (F.P.)
Pathologie médicale	Milliez (P.)
Pathologie respiratoire	Turiaf (F.)
Pathologie et thérapeutiques générales	Boudin (G.)
Pharmacologie	Cheymol (J.)
" (Profr à titre personnel)	Levy (Melle J.)
Physiologie	Binet (L.)
" (Profr à titre personnel).....	Bargeton (D.)
" (" " ")	Parrot (J.)
Physiologie et pathologie obstétricale	Lepage (F.)
Physique médicale	Dognon (A.)
" (Profr à titre personnel)	Djourno (A.)
Radiologie médicale	Desgrez (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	Léger (L.)
Thérapeutique	Conte (M.)

II - PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES et MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

Anatomie	Cabrol (C.)
	Couineud (C.)
	Olivier (G.)
	Gauthier-Villars (Melle P.)
	pr. s. ch.
Anatomie pathologique	Busser (F.)
	Orcel (L.)
	Paillas (J.)

Anesthésiologie	Vourc'h (G.)
Bactériologie	Barbier (P.) Christol (L.) Tournier (P.)
Biochimie médicale	Desgrez (P.) pr. s. ch. Polonoski (J.)M.conf.
Biologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports	Plas (F.)
Carcinologie	Denoix (P.) Mathe (G.)
Dermato-Syphiligraphie	Duperrat (B.)
Electro-Radiologie	Ledoux-Labard (G.)
Hématologie	Bilski-Pasquier (G.) Dausset (J.)
Histologie	Coujard (A.)pr.s.ch. Marois (M.) Racadot (J.)
Hydrologie	Cornet (A.)
Hygiène	Boyer (J.)pr.s.ch. Gorre-Hurst (Mme L.)
Maladies infectieuses	Bastin (A.) Dupont (V.)
Médecine légale	Derobert (L.)pr.s;ch. Hadengue (A.) Fournier (E.) Gueniot (M.)
Médecine du Travail	Albahary (C.)
Neurologie	Lhermitte (F.)
Obstétrique	Granjon (A.) Hervet (E.) Le Lorier (G.) Morin (P.) Musset (R.) Robey (M.) Thoyer-Rozat (J.)

	Joseph (R.)
	Mende (R.)
Pédiatrie-Puériculture	Mozziconacci (P.)
	Polonovski (C.)
	Rossier (A.)
Pharmacologie	Boissier (J.)
	Lechat (P.)
Physiologie	Dejours (P.)
	Gourgerot (L.) m.conf.
Physique médicale	pr.s.ch.
	Kellershohn
Pneumo-phtisiologie	Kreis (B.)
Psychiatrie	Pichot (P.)
Psychiatrie infantile	Duché (D.)
Rhumatologie	Delbarre (F.)
	Cernéa (P.)
Stomatologie	Chaput (Mme A.) m.c.agr.
	Grellet (M.)
Thérapeutique	Chassagne (P.)
	Lamotte (M.)
Urologie	Quenu (L.)

III - PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

Anatomie	Debeyre
	Aboulker (P.)
	Ameline (A.) pr.s.ch.
	Huguier (J.)
	Olivier (C.)
Clinique chirurgicale	Padovani (P.)
	Poilleux (F.)
	Roux (M.)
	Verne (J.M.)
	Domart (A.)
	Perrault (M.)
Clinique médicale	Rambert (P.)
	Thieffry (S.)

Ophtalmologie	Brégeat (P.) Saraux (H.)
Orthopedie	Judet (R.) Ramadier (J.)
Oto-rhino-Laryngologie	Debain (J.)
Parasitologie	Chabaud (A.) Barcat (J.) Binet (J.-P.) Cauchoix (J.) Chatelin (C.-L.) Dubost (Cl.) Dubost (Ch.)
Pathologie chirurgicale	Faurel (J.) Flabeau (F.) Germain (A.) Loygue (J.) Mercadier Perrotin (J.) Robert (H.) Thomeret (G.)
Pathologie exotique	Schneider (J.) Crosnier (J.) Hartmann (L.)
Pathologie experimentale	Loeper (J.) Maurice (J.) Richet (G.) Aussannaire (M.) Bour (H.) Bouvier (J.) Bouvrain (Y.) Bricaire (H.) Brissaud (H.) Brocard (H.) Buge (A.) Castaigne (P.) m.conf. Catinat (J.)
Pathologie medicale	Contamin (F.) Coury (C.) Frezal (J.) Housset (E.) Laroche (Cl.) Lesobre (R.) Macrez (C.) Nick (J.) Péquignot (H.)pr.s.ch. Royer (P.) Wolf fromm (R.)

Clinique obstétricale	Grasset (J.) Mayer (M.) Ravina (J.)
Clinique ophtalmologique	Desvignes (P.) Offret (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique	Mauro (R.)
Clinique pédiatrique et puériculture .	Laplane (R.)
Clinique psychiatrique	Baruk (H.)
Clinique urologique	Kuss (R.)
Medecine légale	Gaultier

IV - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	Haudufroy (P.) pr.s.ch.
Pathologie chirurgicale	Rudler (J.) pr.s.ch.

V - CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

Boltanski (E.)
Launay (C.)

Secrétaire général de la Faculté	M. Léna (J.)
Secrétaires	Mme Benrland (H.) Melle Chaintreuil (G.) Mme Roche (L.)
Conservateur en Chef	Mr le Docteur Hahn (A.)
Conservateur	Melle Dumaitre (P.)
Bibliothécaires	Mme Conter (J.) Mme Forget (F.) Melle Laurent (H.) Melle Le Noir (G.) Melle Quiévreux (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1938, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

EN PRESENCE DES MAITRES DE CETTE ECOLE, DE MES TRES CHERS
CONDISCIPLES ET DEVANT L'EFFIGIE D'HIPPOCRATE, JE PROMETS
ET JE JURE D'ETRE FIDELE AUX LOIS DE L'HONNEUR ET DE LA
PROBITE DANS L'EXERCICE DE LA MEDECINE. JE DONNERAI MES
SOINS GRATUITS A L'INDIGENT ET N'EXIGERAI JAMAIS UN SA-
LAIRE AU-DESSUS DE MON TRAVAIL. ADMIS DANS L'INTERIEUR
DES MAISONS, MES YEUX NE VERRONT PAS CE QUI S'Y PASSE;
MA LANGUE TAIRA LES SECRETS QUI ME SERONT CONFIES, ET
MON ETAT NE SERVIRA PAS A CORROMPRE LES MOEURS NI A
FAVORISER LE CRIME. RESPECTUEUX ET RECONNAISSANT ENVERS
MES MAITRES, JE RENDRAI A LEURS ENFANTS L'INSTRUCTION
QUE J'AI RECUE DE LEURS PERES.

QUE LES HOMMES M'ACCORDENT LEUR ESTIME SI JE
SUIS FIDELE A MES PROMESSES ?

QUE JE SOIS COUVERT D'OPPROBE ET MEPRISÉ DE
MES CONFRERES SI J'Y MANQUE.

A MA GRAND'MERE

A MA MERE

A MON PERE

En témoignage de mon affectueuse reconnaissance

A MA FEMME

A TOUS MES PARENTS ET AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

LE DOCTEUR Jean VERNE

Membre de l'Académie de Médecine

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

Commandeur de la Légion d'Honneur

qui nous a fait l'honneur de nous accueillir
dans son laboratoire, et d'accepter la présidence
de cette thèse.

En témoignage de notre profond respect

AU DOCTEUR Roger COUJARD

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

dont les conseils nous ont été précieux,

Qu'il trouve ici l'expression de nos
remerciements très respectueux.

AU DOCTEUR Léon OLIVIER

Délégué dans les fonctions de
Chef de Travaux Pratiques à la Faculté de
Médecine de Paris

qui nous a inspiré le sujet de cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre
profonde reconnaissance et de toute
notre amitié.

AU DOCTEUR MAROIS,

AU DOCTEUR RACADOT

Professeurs Agregés à la Faculté
de Médecine de Paris

AUX DOCTEURS MAILLET, SCHRAMM et WEGMANN

Délégués dans les fonctions de Professeurs
à la Faculté de Médecine de Paris

A MADAME LE DOCTEUR COUJARD

Chef de Travaux Pratiques à la Faculté
de Médecine de Paris

AU DOCTEUR Marcel SEGUIN

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

Ancien Chef de Clinique à la Faculté
de Médecine de Paris

Médecin Chef de l'Hôpital de Mantes la Jolie

Guide patient de nos efforts, il nous a
enseigné l'esprit de dévouement auprès
de ses malades.

En témoignage de notre amitié et de notre
respectueuse reconnaissance.

AU DOCTEUR Daniel HAMEL

Ancien Externe en Premier des Hôpitaux de Paris

Médecin Chef de Service à l'Hôpital de
Mantes la Jolie

En témoignage de notre profond respect et
de notre reconnaissance.

A TOUS LES CHEFS DE SERVICE DE L'HOPITAL DE MANTES LA JOLIE

Tous nos remerciements

AU DOCTEUR M.J THARANNE

Avec toute notre amitié.

A TOUS NOS COLLEGUES ET AMIS DU LABORATOIRE D'HISTOLOGIE
DE LA FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

I N T R O D U C T I O N

Pour étudier les tissus, les auteurs anciens ont employé la dissociation mécanique ou la dissociation chimique pour isoler les éléments cellulaires les uns des autres, de telle sorte qu'ils se présentent en couches suffisamment minces pour être transparents et pouvoir être étudiés au microscope en lumière transmise. Une autre technique consiste à écraser les cellules pour les faire éclater et libérer leur contenu. Cette "SQUATCH METHOD" est employée pour faire des caryogrammes. Les chromosomes s'étalent en couche mince, pouvant être colorés et identifiés. Pour certains tissus la méthode des frottis permet d'obtenir un résultat analogue, et constitue encore actuellement un moyen précieux d'étude pour la cytologie des éléments figurés du sang et des organes hématopoïétiques, la cytologie des épithéliums et la cytologie cancéreuse. Mais, en fait, les techniques les plus courantes tendent à obtenir des coupes minces, transparentes; de telles coupes respectent l'architecture des différents tissus constituant les organes, permettant ainsi l'étude précise des cellules et des composants cellulaires en place.

La confection des coupes s'est révélée être un problème relativement difficile en ce qui concerne les objets animaux. Il s'agit en effet de tissus qui sont mous, peu cohérents, et qui se prêtent difficilement à l'obtention de coupes minces, tant à l'état frais qu'après durcissement par les fixateurs.

L'histologiste a plusieurs techniques à sa disposition pour obtenir ces coupes. La première technique consiste à effectuer des coupes à main levée. C'est un procédé dans lequel on enrobe le fragment à couper dans la moelle de sureau par exemple, pour avoir un élément plus dur qui entoure le tissu, le soutient, et permet à la lame de rasoir d'éviter son écrasement. Cette technique est encore utilisée pour certains travaux d'anatomie végétale.

Une technique analogue, perfectionnée, consiste à employer les microtomes à main, tel le microtome de Ranvier. L'objet à étudier est placé entre deux demi-baguettes de sureau évidées. Le bloc ainsi formé est placé dans son tube logement. Les coupes sont faites une par une, et l'épaisseur est fonction de la rotation de la tête molletée du microtome, mais plus encore de l'habileté du manipulateur et de la consistance de l'objet. Par ce procédé, on ne peut guère compter faire des coupes dont l'épaisseur serait inférieure à une trentaine de microns (Langeron).

Un autre procédé pour obtenir des coupes minces est la congélation. La congélation permet, en effet, d'amener le tissu à un point de durcissement tel, que le rasoir puisse effectuer des tranches minces. La glace fond, la coupe se déplisse et est ensuite manipulée au moyen de baguettes de verre. La technique à la congélation présente de très gros avantages,

puisque théoriquement elle ne modifie pas les constituants chimiques des cellules. En fait, deux procédés ont été employés pour la congélation:

1) la technique des tissus fixés, dans lesquels les cellules ont évidemment subi des transformations physiques et chimiques du fait du fixateur. C'est de beaucoup la technique la plus utilisée, et elle a donné des résultats précieux, notamment dans certaines écoles, telle l'école espagnole de CAJAL et de DEL RIO HORTEGA.

2) un autre procédé plus moderne d'employer la congélation consiste à utiliser, non plus des tissus fixés, mais des tissus frais, au moyen de cryostats. De tels tissus sont coupés en sections très minces. L'avantage de cette technique est de ne pas modifier les constituants chimiques de la cellule, en particulier ses systèmes enzymatiques. Cette technique sera donc surtout employée en histochimie.

Mais d'une manière courante, les coupes minces sont assez difficiles à obtenir, et les séries pratiquement impossibles. Les coupes à congélation ne sont utilisées que dans des cas spéciaux. Le plus souvent, on a cherché à inclure les tissus ou les fragments tissulaires dans un produit plastique permettant des sections relativement faciles, le produit pénétrant à l'intérieur de tous les interstices.

Lorsque cette matière a pénétré complètement l'objet, on obtient des blocs qui sont commodes à manipuler, ce qui permet de sectionner l'objet en tranches minces à l'aide de

microtomes modernes, du type MINOT. Grâce à cette technique, on peut, d'une part obtenir des coupes avec facilité et constance et, d'autre part, les numérotter et faire ainsi des séries.

Ces méthodes d'inclusion facilitent les coupes de grande taille, et de là sont utilisées tant pour la cytologie que pour l'histologie, et même pour l'anatomie microscopique, de grandes surfaces pouvant être obtenues par de tels moyens.

Les masses d'inclusion utilisées peuvent se diviser en plusieurs catégories :

La première consiste en des masses qui sont anhydres. Ce sont des substances qui ne se mêlent pas à l'eau des tissus, et qui vont donc nécessiter, après fixation, des traitements particuliers destinés à chasser cette eau. L'alcool est le produit employé pour cette opération de deshydratation. Après avoir été deshydraté, l'objet est imprégné par la substance plastique. Trois procédés en la matière sont surtout utilisés :

a) Les coupes à la paraffine.

Les tissus à inclure dans la paraffine nécessitent, après la deshydratation, un nouveau traitement : un passage par des hydrocarbures qui pourront alors se mélanger à la paraffine, mais qui ont pour inconvénient de dissoudre les graisses des tissus. La méthode à la paraffine est de beaucoup la plus employée. Elle fournit des "rubans" qui sont maniables et qui se laissent faci-

lement coller à la surface des lames. D'autre part les coupes à la paraffine se laissent colorer par de nombreuses méthodes : techniques tant de colorations histologique, qu'histochimiques. Mais il faut cependant faire la réserve que les cellules ont subi une deshydratation et sont passées par les solvants des graisses, de telle sorte qu'un grand nombre de leurs constituants ont été éliminés.

Par ailleurs, l'inclusion à la paraffine nécessite un séjour plus ou moins prolongé des fragments tissulaires dans un bain de paraffine. Ces paraffines ont un point de fusion variable, en moyenne 45 à 56°C selon l'épaisseur de la coupe que l'on veut pratiquer. Cette immersion des objets dans les bains de paraffine entraîne une rétraction de leurs constituants, modifiant leurs dimensions et déterminant des modifications qui sont variables suivant les éléments, certaines cellules se rétractant plus que d'autres. Citons notamment les cellules cartilagineuses et les cellules nerveuses.

Compte tenu de ces critiques que l'on peut apporter à la méthode à la paraffine, il s'agit là d'un procédé universellement employé.

Certains auteurs préconisent l'adjonction de certaines substances à la paraffine, dans le but d'avoir une cristallisation moins importante, et, par suite, de meilleurs coupes. On a proposé l'addition de 5 % de cire d'abeille pure, d'huile de ricin, de cire de laurier, de caoutchouc pur, etc., mais sans que ces divers pro-

cédés apportent une amélioration réelle.

b) Le deuxième procédé de masse anhydre consiste en l'inclusion à la celloïdine. La celloïdine ou Collodion est une solution de fulmi-coton (Nitrocellulose) purifié dans un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther sulfurique (alcool-ether). La méthode à la Celloïdine consiste à deshydrater la pièce en un premier temps dans l'alcool absolu, puis à l'imprégner par la solution de Nitrocellulose. C'est un procédé qui est extrêmement long, pouvant demander des mois pour que la Celloïdine puisse imprégner toute la préparation. Là encore, comme pour la paraffine, on peut faire comme reproche que l'alcool et l'éther ont dissout une partie des graisses. La méthode n'en demeure pas moins utile, d'une part par la grande taille des coupes qu'elle permet d'obtenir, par exemple un cerveau en totalité, d'autre part par l'absence de rétraction et de distorsion, ce qui est précieux pour les pièces qui se rétractent au cours des inclusions à la paraffine.

c) Plus récemment sont apparues certaines substances plastiques, du type des résines : les méthacrylates. Leur emploi est surtout réservé à la microscopie électronique, mais a été aussi préconisé pour la microscopie optique. Le matériel d'inclusion le plus employé est le méthacrylate de butyle qui est polymérisé à l'aide de peroxyde de benzoyl comme catalyseur (1 à 1,8 %). Néanmoins, il faut là également une deshydratation des tissus par l'alcool absolu, d'où la dissolution d'une partie des graisses.

Une autre grande catégorie de masses d'inclusion est

constituée par des masses qui ne sont pas anhydres. Ces masses aqueuses permettront d'infiltrer les objets dans les deshydrater, et par là même, éviteront certaines rétractions. D'autre part, elles pourront, dans certains cas, éviter la dissolution des graisses, reproche que l'on fait aux méthodes précédentes.

En fait, à l'heure actuelle, ces masses aqueuses sont peu nombreuses, et ont été très peu employées. On a proposé la gomme glycérinée, qui est un mélange de gomme arabique et de glycérine. Cette solution permettrait d'inclure à froid les objets très durs tels que des poils ou des organes chitineux. On a proposé également la gelatine glycérinée, commode dans les cas où les organismes sont très riches en eau, mais on a reproché à cette masse de prendre les colorants plasmatiques et par là même de masquer les cellules.

Quant au savon qui a été proposé, c'est là une méthode qui n'a pas eu un très grand succès.

Plus récemment, d'autres masses d'inclusion sont apparues. Ces masses d'inclusion consistent en de nouvelles matières à caractère plastique: ce sont les polyéthylène glycols ou leurs stérates. Ces substances ont été recommandées, car certaines d'entre elles sont miscibles à l'eau et permettent d'obtenir des blocs dont la consistance est semblable à la paraffine. On pourrait donc avoir là une méthode conciliant les avantages des coupes à la paraffine, sans en avoir les inconvénients.

Nous nous sommes proposés, dans ce travail, de passer en revue les travaux effectués avec ces polyéthylène glycols et d'étudier les conditions dans lesquelles ils peuvent être employés.

PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Sous le terme de Polyéthylène glycols on désigne des polymères ayant la formule générale :



où n est au moins égal à 4. Ces polymères sont des produits solides ou liquides, solubles dans l'eau, onctueux, et non volatils.

Les Polyéthylènes glycols, où R est un groupe hydrogène, sont les plus employés. On les appelle encore Polyoxy-éthylènes glycols. Ils sont liquides lorsque leur poids moléculaire moyen se situe entre 200 et 600. Lorsque leur poids moléculaire est supérieur à 1000, ils sont solides. Lorsque le radical R est un groupe méthyl, ils prennent le nom de méthoxypolyéthylène glycols. ceux-ci sont visqueux pour un poids moléculaire de 350, mous pour un poids moléculaire de 550 à 750. Ces différents produits ont été fabriqués et vendus par la firme américaine "UNION CARBIDE CORPORATION" sous le terme générique de CARBOWAX. Actuellement ces produits sont fabriqués par différentes firmes sous des noms divers : NAPHTACHIMIE, KUHLMANN, AQUAFFIN pour la Maison Bayer, NYCOLINE en France par la Maison Nyco, POLYWACHS pour la Maison Huls ...

Pour les besoins de l'histologie, ce sont essentiellement les Polyéthylènes glycols qui ont été employés par les auteurs.

SPECIFICATIONS

POLY-ETHYLENE GLYCOLS	DESCRIPTION	COULEUR	POIDS MOLECULAIRE	VISCO-Cst à 100°C	PH sol aqueuse à 25 °	POINT de congélation °C	ACIDITE % poids acide scétique
300	liquide limpide inodore	≤ 50APHA	280-310	5,3-6,3	- 5 - 8	- 15 à - 0	< 0,02
400	"	"	380-420	6,5 - 8,2	"	+ 4 à + 8	"
600	"	"	570-630	9,2 - 11,8	"	+ 20 à + 25	"
1500	solide cireux inodore	≤ 25APHA §	1600 - 2000	30-40	5-7,5	+ 43 à + 46	< 0,02
4000	"	" §	3000 - 3700	75-85	"	+ 53 à + 58	"

§ en solution aqueuse à 25 °.

CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

POLYETHYLENE GLYCOLS	DENSITE 20/ 20° C	INDICE DE REFRACTION n 20 / D	§ H	MISCIBILITE A l'EAU A 20° C
300	1,125	1,464	60	Totale
400	"	1,466	55	"
600	"	1,469	40	"
1500			30	60 à 65 % totale à 60°C
4000			30	60 à 65 % totale à 60°C

§ H : Hygroscopicité (glycérine = 100)

La solubilité des Polyéthylènes glycols est résumée dans le tableau suivant emprunté à l'UNION CARBIDE CORPORATION.

P. cent par en poids approximatif				
	POLYETHYLENE GLYCOL 400		POLYETHYLENE GLYCOL 4000	
	20° C	50° C	20° C	50° C
eau	C	C	60,3	84
méthanol	C	C	35	C
Ethanol 100 %	C	C	< 1	C
Acétone	C	C	< 1	99
Ether Dichloréthylique	C	C	25	85
Trichloréthylène	C	C	30	80
Acétate d'Ethyle	C	C	< 1	93
Phtalate de diméthyle	C	C	13	74
Phtalate de dibutyle	C	C	< 1	55
Ether éthylique	I	I (a)	I	I
Ether isopropylique	I	I	I	I
Toluène	C	C	< 1	C
Heptane	I	I	< 0,01	< 0,01
(a) Insoluble au point d'ébullition I = Insoluble C = plus de 100 g par 100 cm ³ de solvant.				

Quant aux compatibilités c'est également à l'UNION CARBIDE CORPORATION que nous devons ce tableau :

	POLYETHYLENE GLUCOL 400	POLYETHYLENE GLUCOL 4000
Nitrocellulose	C	PC
Paraffines	I	I
Cire d'abeille	I	I
Gomme arabique	I	I
Huile de ricin crue	I	I
Huile d'olive	I	I
Caséine	C	PC
Zéine	C	PC
Gélatine	I	I
C = compatible ou soluble PC = partiellement compatible I = incompatible		

Les Polyéthylène glycols sont des produits faciles à manipuler. Ils sont pratiquement ininflammables. Leur toxicité a été étudiée par HENRY SMYTH, CARPENTER, CARROL C. WEIL du point de vue toxicité orale. Ces auteurs ont introduit des Polyéthylènes glycols dans le régime des rats pendant deux ans et de chiens pendant un an. La toxicité est d'autant plus faible que le poids moléculaire du produit est plus élevé. Par ce travail, ils confirment la non toxicité orale de ces corps.

Ces mêmes auteurs ont démontré que la toxicité cutanée et parentérale est pratiquement nulle. Les Polyéthylènes glycols ont été utilisés comme véhicules pour les injections parentérales. Ils ont conclu que l'huile d'arachide ne donnait aucune réaction au lieu d'injection, tandis que le polyéthylène glycol 300 donne une petite inflammation transitoire que l'on retrouve à l'examen microscopique, mais qui disparaît en une quinzaine de jours. Ces auteurs considèrent que ces produits ne sont pas toxiques et qu'ils peuvent rendre de grands services.

Le produit n'est pas irritant pour la peau, et il est extrêmement employé en pharmacologie et en dermatologie pour faire des pommades, car les risques de sensibilisation sont pratiquement nuls. Ils ont servi à faire des pommades, des comprimés, etc...

La cristallisation du Carbowax a été étudiée en 1949 par NADKARNI, MEYERS et ZOPF. Cette étude a été motivée par les difficultés que l'on rencontrait parfois dans son emploi comme excipient. De temps à autre en effet, les auteurs avaient constaté que le produit cristallisait en un composé rude et granuleux. Ils ont donc étudié les facteurs qui influençaient la cristallisation. Ils ont constaté que si les propriétés physiques proprement dites telles que nous les avons énumérées ci-dessus, étaient un facteur important, les substances qui étaient ajoutées jouaient un rôle considérable.

Ils ont pratiqué leurs observations au microscope entre lame et lamelle, avec d'abord du Carbowax pur. Sa cristallisation

commence autour d'un noyau à partir duquel de nombreuses extensions irradient, venant se croiser avec les formations des noyaux qui se sont formés à l'entour. "Il y a ainsi anastomose et formation d'une barrière à claire-voie" disent les auteurs. Les cristaux de Carbowax pur sont anisotropiques.

A l'état pur, les dimensions des cristaux de Carbowax sont fonction de leurs poids moléculaire et les auteurs donnent les chiffres suivants :

- pour le Carbowax 1500, la taille moyenne des cristaux en millimètres est de 2,13 x 1,42
- pour le Carbowax 1540 : 1,20 x 0,78 (en mm)
- pour le Carbowax 4000 : 0,64 x 0,42 (en mm)
- pour le Carbowax 6000 : 0,28 x 0,21 (en mm)

Lors d'un refroidissement lent, les composés de Carbowax forment de larges cristaux, sphérulitiques. L'addition d'eau diminue légèrement la taille moyenne des cristaux, cependant très grande. En règle générale, les produits tensio-actifs déterminent une perte de l'anisotropie et des modifications de forme des cristaux qui peuvent aller jusqu'à la perte de toute morphologie reconnaissable. Les effets de ces agents tensio-actifs sont variables suivant leur nature. Parmi ceux qu'ils ont étudié, ils constatent que le TERGITOL (un produit de l'Union Carbide Corporation) est le plus efficace, le DUPONOL C (Lauryl sulfate de sodium) est peu actif les TWEEN, par contre, ainsi que les monostéarates de Polyéthylènes glycols déterminent une réduction de taille des cristaux. Pour chacun de ces produits il existe une concentration optimum.

Les travaux sur les Polyéthylènes glycols proprement dits ont été précédés par des tentatives d'utilisation de composés moins polymérisés et estérifiés: les stéarates de diéthylène glycols: ORTON et POST (1932), CUTLER (1935) puis STEEDMAN (1947). Ces produits sont dénommés "ESTER-WAX". Ils obligent à une deshydratation des pièces. Des publications récentes: CHES-TERMAN et LEACH, BESCOT et GUILHAM ont montré l'intérêt de ces produits en histologie et en histochimie.

En 1942, paraît la première publication concernant les Polyéthylènes glycols: RICHARDS, ANDERSON et HANCE proposent l'emploi de Carbowax 4000 en microscopie électronique.

En 1947, Mary CARSTEN indique les avantages de ces produits pour obtenir des coupes en microscopie optique. Elle propose l'utilisation de Carbowax et de distéarate de Carbowax pour inclure des tissus oculaires de la manière suivante:

- 1) imprégnation par un mélange à parties égales de Carbowax 1000 et d'eau pendant une demi heure. Puis,

- 2) quatre séries successives de Carbowax 1000 pur pendant deux heures à 37° C.

- 3) ensuite bain dans un mélange à parties égales de Carbowax 1000 et de Carbowax distéarate 1500 à 45° C.

- 4) enfin quatre bains successifs de Carbowax 1540 distéarate à 45° C pendant deux heures.

Elle conseille de refroidir lentement les blocs pour

éviter de trop gros cristaux. Les coupes sont faites à sept ou dix microns. Les rubans sont obtenus avec facilité mais sont difficiles à coller. L'auteur a fait flotter les coupes sur une solution aqueuse de sucre jusqu'à étalement. L'excès de sucre est épongé avec du papier filtre, puis les préparations sont portées à l'étuve à 37° C pendant au moins deux heures pour que les coupes se collent. Après ce traitement, les coupes sont collodionnées: elles sont deshydratées dans l'alcool absolu pur, l'alcool éther, et enfin plongées dans la celloïdine à 2 %. On laisse sécher les lames pendant cinq minutes en position verticale. Ensuite un passage à l'alcool à 70° solidifie la celloïdine. Les coupes ne doivent pas être tenues sur les lames plus de 24 heures, car la cristallisation du sucre peut éventuellement déchirer les sections. Les colorations employées ont été l'hématoxyline, les trichromes de MASSON, la méthode de VAN GIESON pour les fibres collagènes, la méthode de WEIGERT pour les fibres élastiques et les colorations myéliniques classiques de LOYEZ et SPIELMEYER.

L'auteur signale qu'il n'y a pas de rétraction comme avec la paraffine, ce qui fait l'avantage de la méthode. Ses microphotos de nerf optique et de tache aveugle au grossissement de 55 et 200 montrent l'absence de détachement de la couche pigmentaire des autres couches de la rétine. Elle signale également la rapidité d'inclusion qui ne demande que quatre jours, contre trois semaines avec les inclusions à la paraffine. Malheureusement les difficultés pour couper le cristallin sont les mêmes qu'avec la paraffine.

A partir de cette date, de nombreux travaux ont été réalisés sur les inclusions avec le Carbowax. Nous avons relevé dans la littérature ces publications en précisant les produits employés:

- 1949: CANIVENC et MAYER (Bordeaux): Scurol
- 1950: BLANK, Mc CARTHY, DELAMATER: Carbowax 4000 et 1500
FIRMINGER: Carbowax 4000 (accessoirement Carbowax 1500)
- 1951: Mc LANE: Carbowax 4000
VAN HORNE et ZOPF: Carbowax 4000 et 1540
RINEHART et ABUL HAJ: Carbowax 1000
BLANK et Mc CARTHY: Carbowax 4000 et 1500
- 1952: HALE: Hydrowax
MILES et LINDER: Nonex
WADE: Carbowax 1540 et 4000
TIETZ: Aquaffin
- 1953: SCHWARZ et VESTER: Crémolan
LINSKENS: Aquaffin
WALTER: Cremolan
- 1954: GOLAND, JASON et BERRY: stearates de Carbowax 600 et 1000, Laurates de Carbowax 4000, Oléate de Carbowax 6000
SANDRITTER-KIRSTEN: Polywachs 1000 et 2000
- 1956: ARMSTRONG - RICHARSON et YOUNG: Nonex
- 1958: ZUBIGE - KOPACZYK
GIOVACCHINI: Carbowax 4000 et 1500
FREDRICSSON: Polyéthylène glycol du type Carbowax 1540

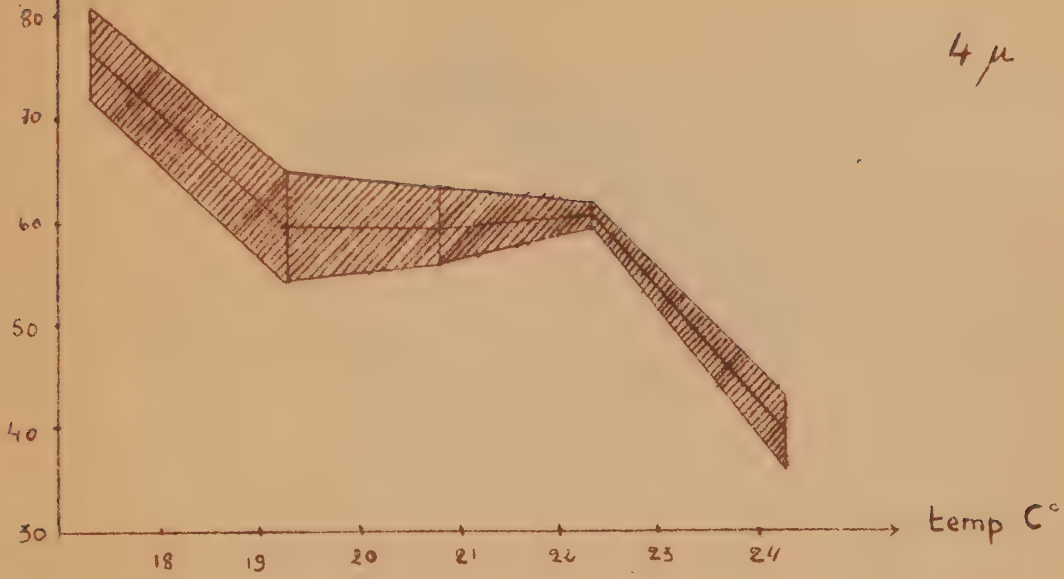
acides gras, des savons, des cires, des terpols ou des phosphatides". Si l'on veut pratiquer l'inclusion dans ces cas il faut d'abord traiter le tissu par un solvant des graisses. Il trouve que l'emploi de concentrations croissantes de Carbowax (technique de CARSTEN) dans l'eau n'est pas nécessaire pour obtenir de bonnes imprégnations. Il emmagasine les blocs dans des sachets en cellophane pour éviter leur altération à l'humidité.

VAN HORNE et ZOPF, appliquant la technique en botanique, indiquent que, pour obtenir des imprégnations correctes de tissus végétaux par le Carbowax, il est absolument nécessaire de réaliser une deshydratation pour éviter une rétraction et des distortions tissulaires. Ils proposent les solutions suivantes: d'abord un mélange de Polyéthylènes glycols 400 et 75 % d'eau, puis 50 % de Polyéthylènes glycols et 50 % d'eau, puis, 80 % de Polyéthylènes glycols et 20 % d'eau, puis 95 % de Polyéthylènes glycols 400 et 5 % d'eau et enfin Polyéthylène glycol pur, les tissus restant dans chacun de ces bains jusqu'à ce qu'ils tombent au fond. En ce qui concerne l'enrobage, l'auteur, comme CARSTEN, propose d'ajouter 1 à 2 % de WAFER 20. Le mélange qu'ils emploient contient 15 à 25 % de Carbowax 1000 et le reste de Carbowax 1540. Dans la confection des blocs, VAN HORNE souligne qu'un refroidissement rapide assure une fine cristallisation et la transparence du bloc.

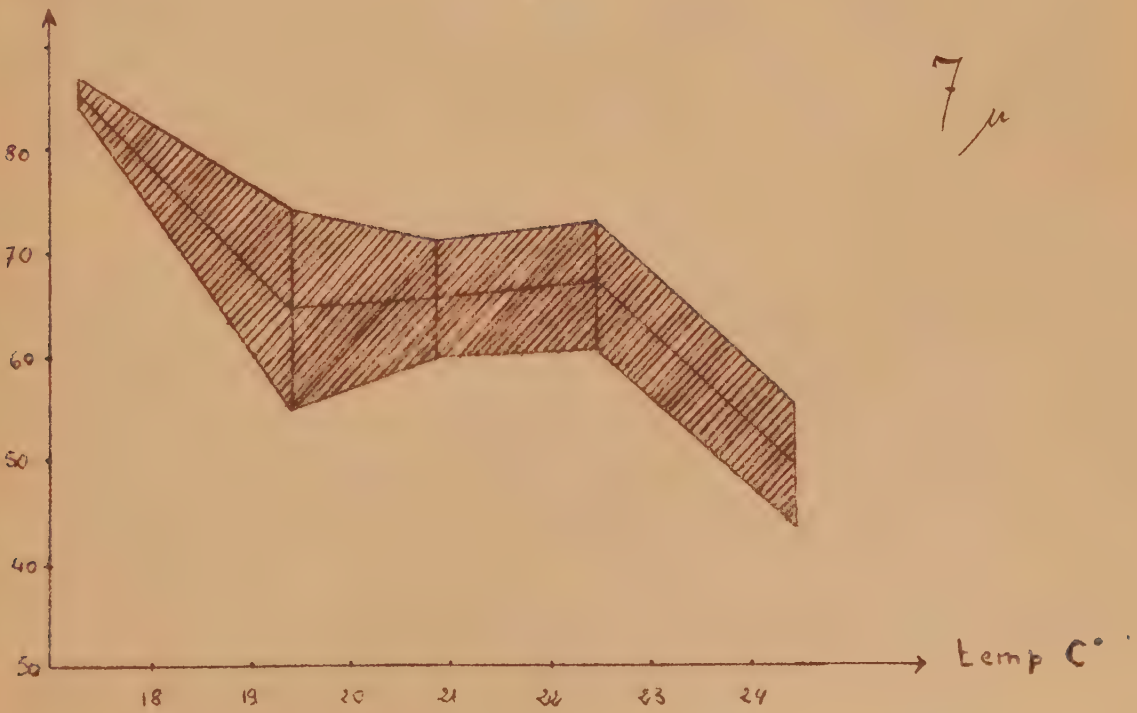
II.- Les conditions pour que les rubans s'effectuent correctement, ont donné lieu à un travail important de HALE. L'auteur,

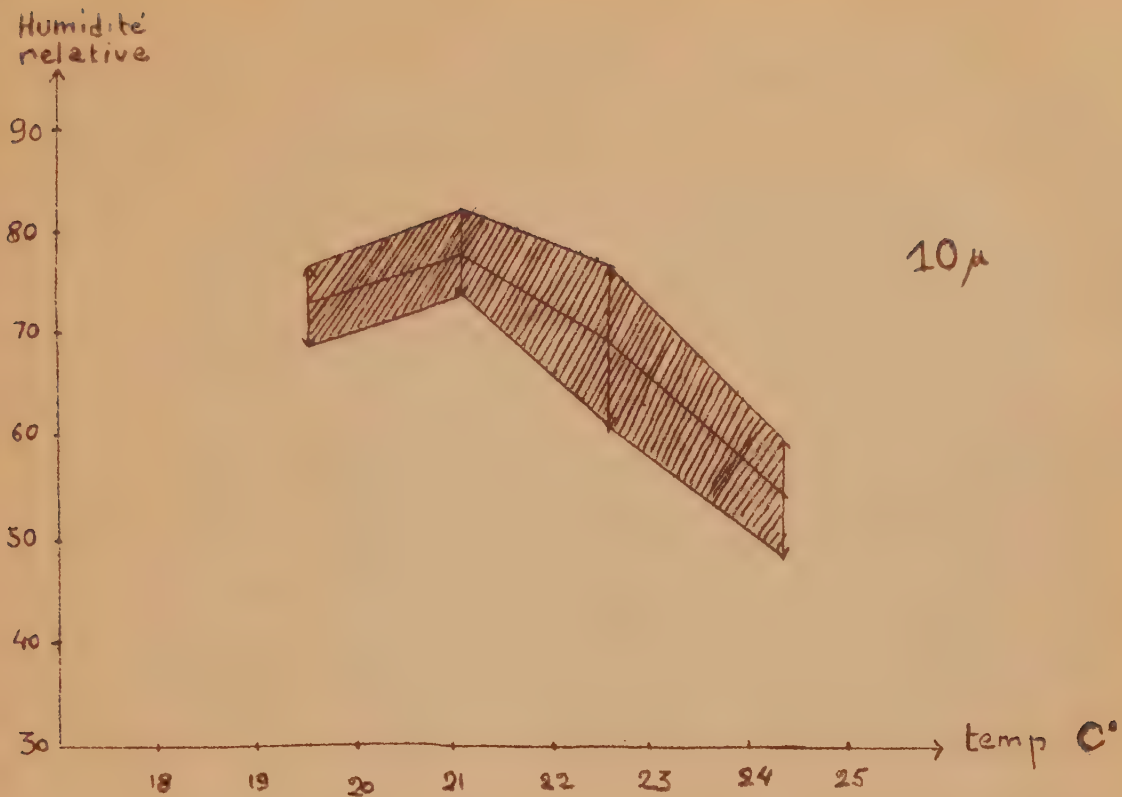
travaillant dans le climat humide de l'Ecosse, avait eu de grosses difficultés pour obtenir de bonnes coupes, et il avait été amené à remarquer qu'une humidité élevée entraînait une absorption d'eau par la surface des blocs, rendant la coupe et la manipulation ultérieure impossibles. Il a donc essayé de faire varier les conditions d'humidité relative et de température en appréciant dans chaque cas, comment les rubans se faisaient et comment les coupes se réalisaient. L'expérience a été menée dans une pièce hermétiquement close, où température et humidité étaient variables et contrôlées à volonté. Le milieu d'inclusion était celui de BLANK et Mc CANTHY (Carbowax 4000: 9 parties, Carbowax 1000: 1 partie. Les coupes ont été pratiquées à 4, 7 et 10 microns et les résultats portés sur des graphiques rapportés ci-après:

Humidity
relative



Humidity
relative





Du point de vue humidité relative, les courbes inférieures indiquent la limite possible de rubanage et de sections correctes. Les courbes supérieures indiquent le degré d'humidité relative au dessus duquel coupes et rubanage échouent tous les deux. Les conditions optima étant réunies entre les courbes supérieures et inférieures.

On voit que ces graphiques montrent, que pour une température donnée, au fur et à mesure que le degré d'humidité augmente, la confection des rubans devient de plus en plus difficile, jusqu'à ce que, finalement, les coupes elles-mêmes ne puissent plus être réalisables.

Quand la température diminue, le taux d'humidité maximal pour lequel la technique des coupes est encore possible augmente, quand la finesse de la coupe diminue, le degré d'humidité relative pour une température donnée augmente. Ces conclusions

de HALE sont importantes puisqu'elles fournissent les constantes physiques en dehors desquelles la confection des coupes n'est pas réalisable avec la méthode (tout au moins pour le mélange donné). Il en est de même avec la paraffine, mais les conditions paraissent par certains points beaucoup plus sévères, notamment le degré d'humidité relative.

III.- Le collage des coupes semble être le point le plus délicat, et en tous cas celui qui a été le plus signalé comme tel par tous les auteurs qui ont travaillé le problème. On a vu que Mary CARSTEN employait d'abord un collage avec une solution de saccharose, puis un collodionnage des coupes.

La méthode de Mary CARSTEN a été utilisée par d'autres auteurs, notamment par MILES et LINDER. CANIVENC et MAIER de Bordeaux emploient également une technique de collodionnage, mais ils pratiquent l'étalement de la coupe simplement sur de l'eau distillée.

ARMSTRONG, RICHARDSON, JONES et YOUNG emploient également une technique de collodionnage, mais, au lieu d'employer de simples lames, ils utilisent des lames gélatinées à l'avance par trempage dans une solution de gelatine; ces lames sont ensuite égoutées, puis séchées. Les sections sont étalées sur de l'eau distillée, essorées avec du papier filtre qui est ensuite recouvert d'alcool-formol dans la proportion 9 / 1. Une fois la gelatine tannée, le collodionnage est pratiqué suivant les techniques classiques.

La plupart des auteurs ne collodionnent pas les préparations. BLANK et MC CARTHY proposent de coller les coupes au moyen d'une solution d'eau gélatinée. Ils donnent la formule suivante:

- Bichromate de potassium : 0,2 g
- Gélatine : 0,2 g
- Eau distillée : 1000 ml

La solution est mise à bouillir cinq minutes à la lumière du jour, puis elle est filtrée. Les coupes sont recueillies sur cette solution. Le Carbowax se dissout instantanément et on fait sécher les coupes complètement avant de colorer.

WADE, au lieu d'une solution d'eau gélatinée qui ne lui a pas donné satisfaction, propose une méthode préconisée anciennement par Gustave MANN: une goutte d'albumine de Mayer est mise sur la lame à l'aide du bout du doigt. Le surplus est rapidement enlevé d'un coup sec et la fine pellicule qui persiste est mise à sécher. On obtient ainsi des lames prêtes à l'emploi. On fait ensuite flotter le ruban sur l'eau, mais WADE insiste sur le fait que les préparations dans ces conditions subissent des détériorations, et se désintègrent facilement.

A la suite de FIRMINER, il propose d'abaisser la tension superficielle. Au lieu d'employer du savon comme cet auteur, il trouve que le TERGITOL (Union Carbide Corporation) fournit un meilleur liquide d'étalement, en ce sens que la cire se dissout moins rapidement que dans l'eau distillée pure et que les forces de tension superficielle étant moindres, il n'y a pas de distortion. La

formule du liquide d'étalement est la suivante: TERGITOL en solution aqueuse à 0,005 % à laquelle est ajouté 10 % de Carbowax 1540.

En 1952, ce problème du collage des coupes est repris par RINEHART et ABUL HAJ. Les auteurs qui font des coupes jusqu'à une épaisseur de 2 microns, proposent dans un premier temps de faire flotter les rubans sur une solution renfermant:

- Diéthylène glycol : 40 g
- Eau distillée : 50 ml
- Formol à 40 % : 10 ml

Le glycol protège les coupes contre la macération et le déchirement, les empêchant de sécher. Il évite la coalescence des globules graisseux. Le collage proprement dit de la préparation est effectué au moyen d'une solution d'eau gélatinée:

- Gélatine : 10 g
- Eau distillée : 60 ml
- Glycérine : 50 ml
- Phénol : 1 g

Cette solution est étendue sur la lame, et les coupes qui étaient dans la solution de flottage sont recueillies sur cette lame et séchées. Le formol de la première solution dénature la gélatine, la rend insoluble et permet une adhérence correcte. Ils font remarquer que le séchage peut être fait rapidement à l'air en 5 à 10 minutes. Les auteurs insistent sur le fait qu'il ne faut pas laisser sécher complètement les préparations. On peut

au maximum laisser les coupes à l'air pendant quelques jours, tant qu'il reste un peu de glycol.

Cette méthode a été reprise par GIOVACCHINI en 1958, mais les coupes étaient étalées directement sur la solution de gélatine, sans employer de diéthylène glycol.

HALLE a employé aussi une méthode dérivée de celle de RINEHART, en utilisant pour coller, un mélange d'éthylène glycol 1 cm³ et de gélatine à 1,15 g %. Il place un mince film de cette solution sur la lame au moyen d'un petit pinceau. L'étalement est ensuite pratiqué; on fait sécher pendant douze heures à 34°C, ensuite une solution de formol aqueux à 6 % dénature la gélatine et dissout le Polyéthylène glycol, la lame étant ensuite prête pour le collage.

Signalons enfin que VAN HORN et ZOPF avaient préconisé une colle dite "colle de HAUPT" qui comprend de la gélatine à 1 %, du phénol à 2 % et de la glycérine à 15 %. Ce liquide est étendu avec le doigt en fine pellicule et il permet une expansion correcte de la préparation sans dissoudre le Carbowax.

SANDRITTER et KIRSTEN, qui ne trouvent aucun avantage à la méthode de RINEHART, font flotter les préparations dans une solution de Carbowax 1000 à 5 %. Ils effectuent le collage au moyen de sérum-albumine glycélinée. LINSKENS emploie également pour étaler et coller les préparations, la sérum-albumine. Il fait sécher les lames ensuite.

IV.- Les avantages de la méthode.

Les avantages de la methode seraient, d'après les auteurs, de deux ordres:

- d'une part une inclusion excellente,
- d'autre part une meilleure conservation de certains des constituants cellulaires, permettant des études histochimiques que ne permettent pas les autres inclusions.

Une inclusion excellente avec un ratatinement et une distorsion des tissus moindres, qu'avec la paraffine, étaient les points sur lesquels Mary CARSTEN avait le plus insisté; et ceci a été confirmé par les autres auteurs. VAN HORN et ZOPF affirment qu'en histologie végétale les tissus riches en eau sont beaucoup mieux conservés qu'avec la paraffine.

MILES et LINDER ont fait une étude systématique et une analyse quantitative de ce problème. Ils ont réalisé des blocs de foie humain de dimensions connues, et ils ont mesuré quel était le pourcentage de réduction de la surface du bloc après différentes inclusions: paraffine, celloidine, double inclusion celloïdine-paraffine, Nonex 63 B. Ils donnent les chiffres suivants résumés dans le tableau ci-dessous:

Matériel d'inclusion	Rétraction en %	Erreur standard
Paraffine	11,7	+ 0,38 - 0,38
Double inclusion Paraffine-celloïdine	10,8	+ 0,48 - 0,48
Celloïdine	6,0	+ 0,58 - 0,58
NONEX 63 B	4,7	+ 0,21 - 0,21

Une étude analogue a été menée sur des fragments d'os compacts, avec les résultats ci-après:

Matériel d'inclusion	Rétraction en %	Erreur standard
Paraffine	4,0	+ 0,09 - 0,09
NONEX 63 B	0,6	+ 0,18 - 0,18

MILES et LINDER insistent sur l'intérêt des inclusions au NONEX 63 B pour les tissus osseux et dentaires, pour lesquels on n'observe pas les artéfacts de rétraction si courants pour ces tissus lorsqu'ils ont été inclus dans la paraffine.

Dans ce domaine, le travail le plus intéressant est celui de ARMSTRONG, RICHARDSON et YOUNG qui ont employé les inclusions, dans le Carbowax et le Nonex, de tissus nerveux fixés dans le formol, puis postchromés suivant une méthode analogue à celle de REGAUD. Les coupes obtenues par cette méthode sont collées

suivant le procédé donné dans le paragraphe précédent et colorées par les méthodes de BIELCHOWSKY-GROS, par la méthode à l'hématoxyline férique ou celles au protargol. La conservation cytologique est très supérieure à celle que l'on obtient avec les inclusions ordinaires, et les auteurs ont pu ainsi étudier les dendrites des neurones, les mitochondries et les boutons cellulaires. On sait que c'est par cette méthode que WICKOFF et YOUNG ont fait l'étude de la surface du motoneurone, et leurs micro-photographies en microscopie optique avec des grossissements de 2000 témoignent de l'efficacité de leur technique. Malgré ces avantages ARMSTRONG et STEPHENS sont revenus récemment sur leur méthode et ont fait remarquer qu'en employant des chromages de plus courte durée, on pouvait quand même obtenir des coupes à la paraffine avec une conservation et une différenciation des boutons terminaux à peu près aussi bonnes qu'avec la méthode originale.

Du point de vue histochimique, tous les auteurs s'accordent sur le point que les lipides sont conservés dans les coupes effectuées après inclusion dans les Polyéthylène glycols.

Mary CARSTEN avait noté que sur ses préparations de rétine et de nerf optique les colorations myéliniques s'effectuaient particulièrement bien.

BLANK et Mc CARTHY ont montré que le Soudan se prêtait bien à la coloration de ces coupes. Ensuite KINEHART et ABUL HAJ ont montré qu'après inclusion dans le Carbowax 1000 les substances lipidiques étaient maintenues intactes, d'une part par leur forme,

et d'autre part dans leur localisation. Ils ajoutent également que les cristaux de cholestérol restent présents dans les vaisseaux artério-scléreux.

FIRMINGER est l'auteur qui s'est le plus attaché à démontrer la valeur de la technique pour la conservation des lipides. En 1950, dans une communication sur l'absorption des rayons ultra-violets en spectromicroscopie des cellules interstitielles du testicule après inclusion dans le Carbowax, il concluait à la nature stéroïde des inclusions lipidiques de ces cellules. Il s'appuyait pour affirmer cette nature stéroïde, sur la comparaison de l'absorption des rayons ultra-violets en microscopie d'une part et in vitro d'autre part. A la suite de cette communication, une discussion s'est ouverte sur la valeur exacte des inclusions au Carbowax pour la conservation des lipides. Le Docteur R.C. MELLORS de New York a signalé qu'il avait fait avec le fabricant du Carbowax des études systématiques sur la solubilité des lipides dans ces substances; d'où il concluait que le Carbowax ne dissolvait pas les lipides neutres mais dissolvait les substances contenant un noyau benzenique. Il résulterait donc de ces observations que les stéroïdes ne pourraient pas être conservés sur les coupes au Carbowax, contrairement à l'opinion de FIRMINGER. Mais les deux auteurs étaient d'accord sur les difficultés qu'il y a à comparer la solubilité de tels composés in vitro et de composés se trouvant dans les cellules; car ils se trouvent alors liés à des protides, et on sait par exemple pour le cholestérol que les liaisons protido-lipidiques sont difficilement dissociables.

La conservation des lipides a également été signalée par HALE. Cet auteur a montré en outre, que l'inclusion dans le Polywachs permettait une bonne conservation.

En matière d'enzymologie, peu de travaux ont été réalisés. MILES et LINDER signalent la bonne conservation de l'activité phosphatasique-alcaline après inclusion au Nonex. FREDERICSSON a fait un travail sur la conservation de l'activité des phosphatases alcalines et estérases, qui décomposent le naphthyl acetate. Il a constaté après étude in vitro que l'inclusion par les Polyéthylène glycols ne diminuaient pas sensiblement l'activité enzymatique.

A noter par ailleurs dans le domaine de l'histochimie, que des auteurs ont proposé la méthode au freezing-drying, suivie d'inclusion dans le Polyéthylène glycol (BLANK, MC CARTHY et DELAMATER; ZUGIBE, KOPACZICK; CAPE et LAST). Cette méthode permettrait de conserver dans les tissus des substances solubles dans l'eau, et lavées par les techniques ordinaires. BLANK et collaborateurs se sont servis de telles coupes en histoautoradiographie; les sections étant directement appliquées sur l'emulsion nucléaire. Leur étude a porté sur l'incorporation du P^{32} dans le foie de souris. Les techniques de routine déterminent une perte des 4/5 du P^{32} par comparaison avec la méthode qu'ils préconisent.

Citons enfin pour terminer cette bibliographie, que GOLAND, JASON et BERRY ont proposé une méthode d'inclusion combinée d'abord au Carbowax puis à la paraffine, qui permettrait de conserver les lipides sans avoir les inconvénients de manipulation

des coupes au Carbowax, mais leur méthode paraît compliquée et ne semble pas avoir eu de succès.

TRAVAUX PERSONNELS

Notre travail a surtout consisté en l'étude des méthodes d'inclusion au Polyéthylène glycol, sur l'obtention et le collage des coupes. Nous avons également appliqué quelques techniques de coloration à ces coupes.

I.- Technique d'inclusion.

Le Carbowax (Polyéthylène glycol fabriqué par l'Union Carbide Corporation - 30 East 42nd street New York 17, N.Y.) ^{eu} que nous avions à notre disposition a été en quantité trop faible pour permettre des essais systématiques.

Nous nous sommes donc servis d'un Polyéthylène glycol appelé NYCOLINE et mis très aimablement à notre disposition par la Maison NYCO (49-51 rue Guyard Delalin AUBERVILLIERS Seine). Ces Etablissements nous ont fourni des Polyéthylène glycols de poids moléculaire 200, 400, 1000, 1500 et 4000. Il faut d'abord noter là, une différence de terminologie entre les firmes françaises (NYCO et NAPHTACHIMIE) et la firme américaine. Les Polyéthylène glycols trouvés sur le marché français, pour un poids moléculaire de 1500, correspondent en fait au "Carbowax 1540" de l'Union Carbide Corporation. Il existe bien un "Carbowax 1500" de la Carbide, et certains auteurs l'ont utilisé (voir le tableau bibliographique donné précédemment), mais ce "Carbowax 1500" est un mélange à parties égales de Carbowax 300 et 1540. C'est un produit dont le point de fusion est beaucoup plus bas

que les Polyéthylène glycols 1500 français. Quant au Poly thylène glycol que les Etablissements NYCO conditionnent sous l'appellation "NYCOLINE 15/40", il s'agit d'un mélange de Poly thylène glycol 1500 et de Polyéthylène glycol 400 à parties égales.

Ces différentes dénominations nous ont donné quelques difficultés au début de notre étude, car nous confondions la NYCOLINE 1500 et le Carbowax 1500. Les mélanges que nous effectuions alors, n'avaient pas les propriétés physiques indiquées par les auteurs anglo-saxons. Nous avons par la suite compris cette erreur, et employant la NYCOLINE 1500 là où les auteurs utilisaient le Carbowax 1540, nous avons obtenu les mêmes résultats qu'eux.

Notre premier objectif a été d'étudier les propriétés des polyéthylène Glycols pour déterminer ceux qui étaient le plus apte à constituer des blocs pouvant se couper facilement selon les techniques histologiques et classiques, dans les conditions de température du laboratoire (20, 22°C).

La NYCOLINE 200 et la NYCOLINE 400 sont liquides, fortement visqueux à la température ambiante. La NYCOLINE 1000, dans les mêmes conditions est un produit solidifié sous forme d'une masse pateuse que l'on fond facilement en la mettant à l'étuve à 37°.

La NYCOLINE 1500 se présente sous forme de gros blocs blanchâtres dans lesquels apparaissent des cristaux. C'est un produit dont la constitution est ferme, mais dont la dureté est très inférieure à celle des paraffines habituellement utilisées

en histologie (paraffines fondant à 56°C). La NYCOLINE I500 se laisse très facilement rayer à l'ongle; sa surface absorbe après quelques jours un peu de l'humidité du laboratoire, et de ce fait se ramollit légèrement. Elle doit donc être conservée dans des sachets en matière plastique, sous lesquels elle est d'ailleurs conditionnée.

La NYCOLINE 4000 au contraire, est un corps qui est beaucoup plus dur. Il est fourni sous forme de paillettes dont le point de fusion est théoriquement à 56°C. En fait, il faut régler l'étuve à une température plus élevée de 2 à 3°C pour éviter qu'un résidu incomplètement fondu ne reste dans le récipient contenant le produit. La NYCOLINE 4000 est nettement moins hygroscopique que la NYCOLINE I500.

Lorsqu'on a fondu ces produits, et qu'on les place sur une lame chaude qu'on recouvre ensuite d'une lamelle, et qu'on laisse refroidir, on peut observer facilement au microscope le mode de cristallisation, tel que l'ont décrit NADKARNI, MEYERS et ZOPF. La cristallisation se fait en plusieurs temps. Les cristaux sont hérissés de prolongements, et viennent au contact de l'un de l'autre avec de très fines lignes de séparation. (Voir photo).

Nous avons essayé de faire des blocs dans les deux catégories de NYCOLINE I500 et 4000, pour apprécier quelle était la dureté exacte de ces blocs, et leur comportement quand on essayait

de les couper au microtome.

A - La NYCOLINE 4000.

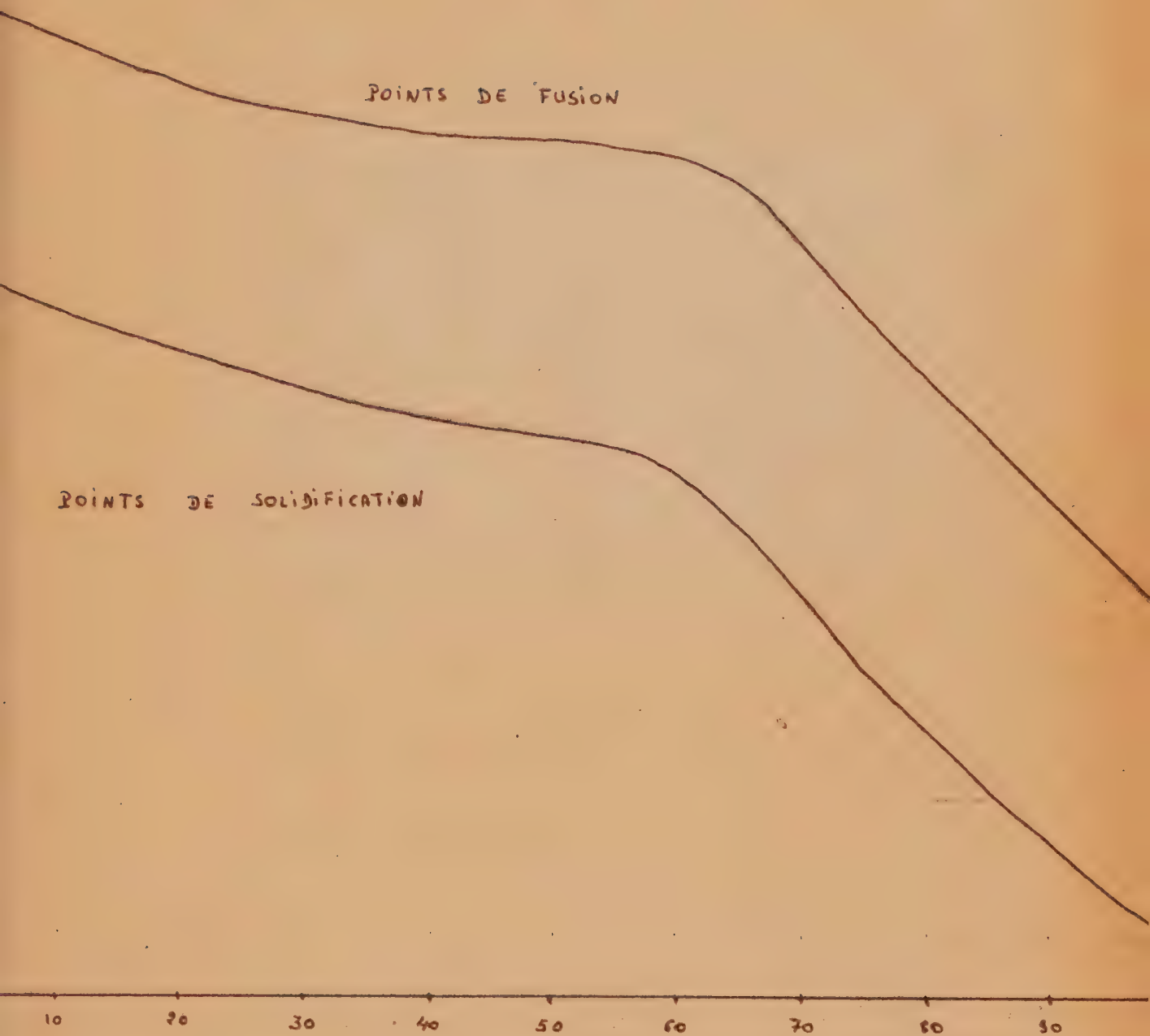
La NYCOLINE 4000 a été fondu à l'étuve ainsi qu'il a été dit et elle a été ensuite coulée dans des barres de LEUCKART, ainsi qu'on le ferait avec la paraffine (LANGERON). Ces blocs, ont après refroidissement à l'air libre une surface qui est légèrement déprimée par la rétraction du produit, mais cette rétraction est très inférieure à celle des blocs de paraffine de même taille. Le bloc proprement dit est très dur, mais il ne donne pas l'impression d'homogénéité; il semble former par un agrégat de petites masses, et la cohésion de ces agrégats semble assez médiocre. De tels blocs se laissent facilement fixer sur le porte-objets du microtome exactement à la manière d'un bloc de paraffine. Les coupes que l'on peut réaliser avec la NYCOLINE 4000 à la température du laboratoire sont assez décevantes, car le produit ne semble pas être suffisamment homogène pour que les coupes se réalisant correctement; ces coupes tendent à s'effriter sur le fil du rasoir quelle que soit l'inclinaison de celui-ci. Ceci est probablement dû au fait que la NYCOLINE 4000, à la température du laboratoire est à un point de solidification trop bas pour permettre de telles coupes. (ceci nous est suggéré par le fait que certains auteurs travaillant sous des climats tropicaux - FIRMINGER - conseillait surtout le CARBOWAX 4000).

B - Les blocs réalisés avec la NYCOLINE I500 sont différents des blocs en NYCOLINE 4000. Alors que les premiers étaient jaunâtres, le bloc de NYCOLINE I500 est blanchâtre, très légèrement

translucide, moins dur que les précédents. Il laisse aux doigts qui le manipulent l'impression que leur surface est onctueuse et très légèrement humide. Il se laisse fixer sur le porte-objet du microtome moyennant certaines précautions, et les coupes se font sans difficultés. Malheureusement ces coupes sont molles et se tassent sur le tranchant du rasoir (la surface de section de chaque coupe est inférieure à la surface du bloc), même lorsque celui-ci est aiguisé au mieux, ceci pour des coupes à 5 microns, car si l'on augmente l'épaisseur des coupes on obtient évidemment des sections qui sont beaucoup moins tassées (ceci est à comparer aux coupes faites à la paraffine molle à 45°C).

Nous avons ensuite procédé à des mélanges de NYCOLINE 4000 et de NYCOLINE 1500. Ne sachant pas à priori quel serait le mélange le plus adéquat à la température du laboratoire, nous avons fait des mélanges de concentrations croissantes de NYCOLINE 1500 dans la NYCOLINE 4000, en ajoutant progressivement à chaque mélange, 10 % supplémentaires de NYCOLINE 1500. En procédant à la confection des blocs de chacun de ces mélanges, sans même inclure de tissus histologiques, pour voir quelles étaient les propriétés de ces blocs devant le rasoir, nous avons constaté que jusqu'à un pourcentage de 50 % de NYCOLINE 1500 dans la NYCOLINE 4000, les blocs avaient des propriétés qui différaient très peu des blocs de NYCOLINE 4000 pure. Par contre, au fur et à mesure que le pourcentage de NYCOLINE 1500 passait de 50 à 100 %, les propriétés se rapprochaient beaucoup de celles de la NYCOLINE 1500 pure. Nous avons établi ensuite les courbes de fusion et de solidification de ces mélanges. Pour faire ces courbes (voir page suivante) nous avons placé 2 cm³ du mélange étudié dans le fond

température
C°



MELANGES DE NYCOLINE 1500 ET 4000.

% EN NYCOLINE 1500.

LES COURBES ONT ETE REALISEES SUR 10 MESURES.

d'un tube à essais. Cette NYCOLINE a été fondue en maintenant le tube dans un bain marie porté à la température de 62°C. Un thermomètre servant en même temps d'agitateur, plongé dans le liquide en fusion permettait de savoir la température à laquelle toute la NYCOLINE était fondue. Le tube était ensuite refroidi à l'air libre, et l'on notait la température quand les premiers cristaux apparaissaient (ce qui se traduit par un louche de la substance primitivement transparente). Ceci nous donnait ainsi un point de fusion et de solidification. Une dizaine de mesures a été effectuée à chaque fois permettant d'établir la courbe montrant que le point de fusion se modifie relativement peu lorsque le pourcentage de NYCOLINE I500 est inférieur à 50 %, tandis que lorsqu'il est supérieur à 50 % le point de fusion diminue très rapidement pour atteindre finalement celui de la NYCOLINE I500.

En possession de ces données, nous avons alors réalisé des infusions d'organes dans ces différents mélanges, depuis des mélanges à parties égales de NYCOLINE I500 et de NYCOLINE 4000 jusqu'à des mélanges de NYCOLINE I500 pure.

II.- Modalités d'inclusions

Nous avons utilisé comme organes, des fragments de rein et des surrénales prélevés sur des souris et des rats (Vistar) adultes. Ces organes ont été fixés au formol à 10 % (pour les reins seulement, nous avons pratiqué quelques fixations au CARNOY) pendant une durée de 36 heures à un mois.

Etant donné que les avis, dans la bibliographie, différaient sur l'utilité ou non d'une "deshydratation" préalable des fragments, nous avons essayé d'inclure directement des fragments

dans le mélange de NYCOLINE choisie. Mais nous n'avons pas obtenu de résultats corrects par ce moyen. Les blocs étaient plus ou moins bien imprégnés, et devant le rasoir du microtome les coupes se faisaient mal, se cassant comme lorsqu'on a un fragment mal imprégné lors d'une infusion à la paraffine. Nous pensons que ceci est dû au fait, que si les polyéthylène glycols de faible poids moléculaire sont très solubles dans l'eau, les polyéthylène glycols de poids moléculaire plus élevé n'ont plus une solubilité très réduite (rappelons qu'elle est de 70 % à 20°C). Par ailleurs, il est probable que dans le cas d'un fragment plongé directement dans la NYCOLINE fondue aux environs de 56° C, l'eau du bloc se mélange lentement à la substance plastique et que pendant ce temps, il se produit une macération et une véritable cuisson des tissus. C'est pourquoi ultérieurement nous avons pratiqué des deshydratations comme l'avaient conseillé Mary CARSTEN, ZORN, ZOPF, RINEHART et ABUL HAJ. Il nous a semblé logique pour pratiquer cette deshydratation de nous servir de la NYCOLINE 200, qui à la température du laboratoire est liquide et miscible à l'eau en toutes proportions. Pour des fragments de quelques millimètres d'épaisseur, nous les avons d'abord plongés dans un mélange de NYCOLINE 200 et d'eau à parties égales pendant une heure, puis de NYCOLINE 200: 75 % - eau 25 %, et enfin un troisième bain de NYCOLINE 200 pure que nous avons en général laissé toute la nuit. Les tissus peuvent d'ailleurs rester plusieurs jours dans cette NYCOLINE 200 sans subir la moindre altération ni le moindre durcissement.

Lorsque les fragments sont mis dans le polyéthylène glycol 200, ils tendent à flotter dans ce produit, et certains auteurs

ont considéré que l'impregnation était terminée lorsque les fragments tombaient au fond du récipient contenant la NYCOLINE. Il semble que ceci ne soit pas tout à fait exact; la densité du tissu intervient et la viscosité du produit est responsable de cette très lente chute des fragments.

Une fois imprégnés de NYCOLINE 200, les fragments ont été portés directement dans les mélanges de NYCOLINE à l'étuve, où ils sont restés des temps variables depuis 1 heure jusqu'à 24 heures. Etant donné la miscibilité parfaite en toutes proportions du Polyglycol éthylène 200 avec le Polyéthylène glycol 1500, le temps d'inclusion peut probablement être écourté; le seul inconvénient étant que le tissu est alors enrobé dans un mélange qui n'a pas tout à fait la dureté du reste du bloc. Une fois l'impregnation faite, la NYCOLINE a été coulée dans les barres de LECKART, le fragment étant inclus exactement comme on le ferait avec des blocs à la paraffine. Les blocs ont été ensuite solidifiés par refroidissement à la température du laboratoire. Bien que ceci soit contesté par certains auteurs, il nous a semblé qu'il n'y avait pas d'avantages à refroidir le Polyéthylène glycol au réfrigérateur, car lorsque le refroidissement se fait trop rapidement il peut arriver qu'il se produise des fentes dans le bloc.

Les mélanges employés et qui ont été le plus apte à obtenir des coupes d'une épaisseur moyenne de 2,5 à 7,5 microns ont été les mélanges de: NYCOLINE 4000: 20 % - NYCOLINE 1500: 80 %.

et: NYCOLINE 4000: 10 % - NYCOLINE 1500: 90 %

A noter que nous avons essayé d'ajouter aux mélanges de NYCOLINE, du TWEEN 20 comme l'avaient conseillé Mary CARSTEN, VAN HORN et ZOPF, mais il ne nous a pas semblé que l'adjonction de

produits abaissant la tension superficielle donnait de meilleurs résultats que le produit pur.

III.- Technique d'obtention des coupes.

La fixation des blocs sur le porte objets du microtome doit se faire avec beaucoup de soins; il faut chauffer suffisamment ce porte objets pour fondre la MYCOLINE, afin que ses griffes s'incrudent dans le bloc, et il y a même avantage à ce que le Polyéthylène glycol déborde le bloc, sinon ce bloc peut se détacher, probablement parce qu'en le chauffant sur la flamme du bec Bunsen, il se forme un peu de vapeur d'eau qui doit diminuer l'adhérence du Polyéthylène glycol à ce niveau. Mais d'autre part, il ne faut pas trop chauffer le porte objets, d'autant que l'on n'a pas la possibilité, comme on le fait fréquemment pour les blocs de paraffine, de le refroidir sous un courant d'eau, puisque le Polyéthylène glycol est soluble dans l'eau.

Les coupes ont été faites avec un microtome du type Minot. Les coupes, faites aux épaisseurs indiquées ci-dessus se font sans aucune difficulté quand le fragment est parfaitement imprégné par le Polyéthylène glycol, et l'on obtient des rubans. Il semble que ceux-ci, du moins dans les conditions où nous travaillons, c'est à dire dans des pièces à faible humidité relative, se fassent mieux qu'avec la paraffine. Ceci est probablement dû au fait que le Polyéthylène glycol étant légèrement hygroscopique, le ruban ne s'électrise pas comme le font les rubans de paraffine. Ils doivent être manipulés avec précaution, au moyen d'un pinceau. Ces rubans ont exactement le même aspect que les rubans de paraffine, la différence étant que leur face inférieure reste mate contrairement à l'aspect brillant de la face homologue du ruban de paraffine.

Avec les mélanges préconisés ci-dessus, nous avons réalisé ainsi qu'il a été dit, des coupes à 2,5, 5 et 7,5 microns.

Le produit se prête mal à des coupes plus épaisses car, à ce moment là, il est un peu trop dur et les sections tendent à se briser sur le fil du rasoir. Pour obtenir de telles coupes, il faut employer la NYCOLINE 1500 pure.

IV.- Le collage des coupes.

Le collage des coupes est certainement, et de loin, le problème le plus délicat des inclusions au Polyéthylène glycol. Il présente en effet beaucoup plus de difficultés, que le collage des coupes incluses dans la paraffine.

Rappelons que le collage des coupes à la paraffine comporte trois temps:

- l'étalement du ruban,
- l'essorage de la coupe,
- le séchage de la coupe.

L'étalement se fait sur de l'eau tiède gélatinée ou albumineuse. Le ruban s'aplanit au contact de l'eau tiède et retrouve sa surface initiale si un certain tassement de la paraffine s'est produit au moment de la coupe. Le fragment tissulaire, totalement enrobé de paraffine, subit le même mouvement d'expansion que le ruban, et les plis, -s'ils existaient-, s'effacent.

Lorsque la température de l'eau est soigneusement réglée, et le bloc parfaitement inclus, il ne se produit aucune dissociation entre l'organe inclus et la paraffine qui l'entoure. Par ailleurs, la quantité d'eau absorbée par les tissus et la paraffine lors de cette opération, est extrêmement réduite, bien qu'on sache

que l'on peut pratiquer des colorations et des digestions de coupes incluses dans la paraffine (in BORM et OPPEL) et qu'un trop long séjour du ruban sur l'eau chaude soit préjudiciable à une bonne conservation des structures collagènes (MASSON).

Après cet étalement, l'eau gélatinée ou albumineuse en excès est égouttée, la coupe est essorée au papier Joseph et mise à sécher à l'étuve à 37° C.

Alors que les coupes des blocs de Polyéthylène glycol s'effectuent de façon exactement identique à celle des blocs de paraffine, ainsi qu'il a été dit ci-dessus, les rubans qui en résultent sont plus délicats à travailler. Il faut, là encore, distinguer l'étalement de la coupe et son collage proprement dit à la surface des lames de verre.

L'étalement des coupes peut s'effectuer sur l'eau ou sur d'autres liquides. L'eau à la température du laboratoire détermine la dissolution presque instantanée du Polyéthylène glycol. Les différences de tension superficielle déterminent alors des courants de diffusion, et un étalement parfait et immédiat de la coupe à la surface de l'eau. Les plis, s'il en existait, disparaissent.

Mais, on se trouve alors dans la situation des coupes faites à la congélation, c'est à dire que les fragments ne sont plus enrobés par aucune substance d'inclusion, avec les risques de dissociation des structures tissulaires et les difficultés de collage qui en résultent.

Il apparaît donc logique pour étaler ces coupes, d'utiliser des liquides ne dissolvant pas le Polyéthylène glycol. Des essais ont été faits dans cette voie, en employant des liquides

non miscibles au Polyéthylène glycol (voir le tableau page 13).
Mais, aucun avantage n'en a été retiré, d'autant qu'il s'agit de solvants des lipides, et qu'il est plus logique de mettre de telles substances au contact de coupes dans lesquelles on desire le maintien de corps lipidiques. On sait que ABUL HAJ et KINEHART ont préconisé l'étalement sur de l'éthylène glycol. Les essais que nous avons pratiqués avec cette substance ne nous ont pas donné de bons résultats. Deux phénomènes peuvent être reprochés à l'étalement sur l'éthylène glycol:

1) au moment où la coupe est placée sur l'éthylène glycol, la substance constituant le ruban se désagrège plus ou moins en petits fragments qui se détachent de la coupe proprement dite, et flottent à la surface de l'éthylène glycol.

2) Il n'y a pas d'étalement véritable de la coupe qui garde son incurvation et qui ne s'aplanit pas. Si alors on égoutte et on essore la préparation, celle-ci n'adhère pas bien à la lame.

Après cet insuccès de l'éthylène glycol, nous avons essayé d'employer des Polyéthylène glycols de faible poids moléculaire (NYCOLINE 200 et 400), dans l'espoir que ces substances de nature identique aux corps ayant servi à l'inclusion, éviteraient la dissociation des coupes observée avec l'éthylène glycol. Mais un phénomène analogue à celui décrit ci-dessus se produit: dissociation de la substance enrobant la coupe et étalement imparfait de celle-ci.

Nous sommes donc arrivés à la conclusion que l'étalement des coupes incluses dans le Polyéthylène glycol devait se faire sur une solution aqueuse, quels que soient les défauts que celle-ci

puisse avoir en dissolvant le produit.

Le collage proprement dit nécessite l'emploi d'une solution gélatinée ou albumineuse. Nous n'avons pas trouvé de différence notable entre ces deux catégories de solution, qui permettent toutes les deux une bonne adhérence de la coupe sur la lame de verre, ceci malgré l'incompatibilité qu'il y a entre le Polyéthylène glycol et la gélatine (se reporter au tableau page 13). Nous avons essayé, à un moment, d'employer une solution de caséine, mais nous ne lui avons trouvé finalement aucun avantage.

Dans l'ensemble, pour effectuer l'étalement des préparations, il y a intérêt à ce que la lame de verre ne soit recouverte que par une mince pellicule de solution aqueuse, car s'il y a trop de liquide, les fragments d'organes ou de tissus risquent d'être entraînés avec l'eau au moment où l'on fait égoutter celle-ci. Par ailleurs, il n'y a pas non plus intérêt à ce que la pellicule de solution soit trop faible, comme on le fait quelques fois quand on emploie l'albumine glycérinée de Mayer. En effet, dans ces conditions, s'il existe des plis sur la surface de la coupe, ceux-ci sont pratiquement impossibles à dissocier lorsque la coupe adhère sur le verre. Il faut agir assez rapidement pour égoutter le liquide et essorer la préparation. Si l'on est allé assez vite, tout le Polyéthylène glycol n'est pas dissout et il en reste suffisamment sur la préparation pour dessiccation complète. Mais, il n'en reste pas moins qu'il y a là un point critiquable, car les coupes collées à la surface du verre se dessèchent partiellement et il est classique que la dessiccation des

coupes à la surface du verre, détermine des modifications morphologiques et de colorabilité des cellules et des tissus (MASSON).

Pour obvier à cet inconvénient, nous avons, après essorage de la préparation avec du papier Joseph, appliqué une mince pellicule de polyéthylène glycol 200 ou 400 à la surface de la coupe. Ainsi, celle-ci s'imprègne d'un polyéthylène glycol et la dessiccation est évitée. Les préparations sont mises alors à l'étuve à 37°C et ne subissent plus de dommages. On peut les y laisser 24 heures ou plus. De telles coupes sont parfaitement collées à la surface de la lame de verre et peuvent ensuite subir les opérations de coloration. Il faut toutefois remarquer que le parenchyme rénal dans notre expérience semble avoir une meilleure adhérence que le cortex surénalien. Ceci est probablement dû à la haute teneur en lipides de la surénaie qui doit de ce fait mouiller moins facilement le verre au moment où l'on essore la préparation.

V - Techniques de coloration appliquées aux préparations incluses dans la NYCOLINE. Résultats.

A - Avant d'être colorées, les coupes sont débarrassées du polyéthylène glycol par simple passage dans l'eau distillée. Nous avons appliqué aux coupes de rein obtenues et coupées à 5 microns (reins de souris, de rat, de chien), des techniques de colorations classiques, c'est à dire : colorations à l'hématéine - erythrosine, à l'hématéine - erythrosine safran, coloration à l'hématoxyline fénique, selon REGAUD, trichrome de MASSON ou WOLF - CLEVELAND, colorations à la fuchsine paralaldéhyde selon GABE, colorations au Soudan.

Une comparaison a été effectuée avec les coupes à la paraffine. Nos préparations de reins fixés au formol, nous ont montré avec les techniques de colorations classiques et montages au baume du Canada, une bonne conservation des différentes structures. Au niveau des nephrons, le glomérule apparaît non rétracté à l'intérieur de la chambre glomérulaire. Au niveau même de ce glomérule, les fines fibrilles collagènes qui doublent le peloton vasculaire et la capsule de Bowman se colorent bien par le bleu d'aniline au trichrome de MASLON. A l'intérieur des capillaires, les hématies sont particulièrement bien conservées, elles ne sont pas rétractées et gardent leur forme de disque biconcave. Dans le tube urinifère proprement dit, au niveau du segment proximal, les bâtonnets de HEIDENHAIN se colorent très bien, même avec les colorations banales. Entre ces bâtonnets de HEIDENHAIN, on voit dans les tubes contournés, notamment chez la souris, de fines granulations éosinophiles. La bordure en brosse est conservée avec son aspect classique de striations dû aux microvillosités. Dans la médullaire, étudiée en coupe transversale et longitudinale, les différents segments de la branche de HENLE, des tubes de BELLINI, ainsi que les canaux de collecteurs, montrent une bonne conservation de leurs structures. Les cellules épithéliales sont parfaitement appliquées sur leur membrane basale et le fin réseau de fibrilles collagènes qui constitue le tissu conjonctif de cette zone. Dans ce tissu conjonctif intertubulaire, des fibrocytes sont visibles avec de fines enclaves cytoplasmiques. Au niveau de la partie proximale des tubes, les macula densa présentent leurs caractères cytologiques habituels : cellules cylindriques hautes, serrées les unes contre les autres. Les noyaux de tous ces éléments

gardent la structure et la colorabilité habituelles.

Dans le rein de chien, des artères interlobulaires ont pu être observées en coupes longitudinales. Leurs cellules endothéliales n'étaient absolument pas retracts; on peut voir, recouvrant leurs noyaux dans le sens du vaisseau, la mince couche cytoplasmique caractérisant ces cellules. Sous l'intima, les fibres musculaires lisses ont leurs caractères cytologiques habituels. A côté de la macula densa, sont visibles les artérioles glomerulaires, avec la condensation des noyaux qui caractérise l'appareil juxta glomérulaire. Au niveau des bassinets, nous avons pu observé l'épithélium des voies urinaires normalement coloré. Au niveau de la capsule du rein, les fibres collagènes orientées sont bien conservées, et à l'immersion les fines fibrilles sont parfaitement visibles, aussi bien en coupe longitudinale qu'en coupe transversale. Le cytoplasme des fibrocytes se colore bien et permet de voir les fines expansions de ces cellules s'appliquer à la surface des fibres.

Sur ces mêmes préparations, nous avons cherché à mettre en évidence les lipides par les méthodes de colorations classiques, au Rouge Soudan, à l'écarlate et au Noir Soudan, suivant la technique conseillée par LISON, le colorant étant dissout dans l'alcool à 70°. Les coupes hydratées ont été passées dans l'alcool à 40°, puis dans l'alcool à 70° et enfin plongées dans la solution de colorant, le colorant étant mis dans un tube BORREL soigneusement fermé pour éviter l'évaporation de l'alcool. Les coupes ont été lavées à l'alcool à 70°, rehydratées, et montées à la glycérine gélatinée. Une coloration nucléaire de contraste a été réalisée pour

certaines préparations au moyen du carmalum. Dans ces conditions, au niveau du rein, nous avons pu voir le chondriome sous forme de bâtonnets de HEIDENHAIN parfaitement colorés par le Noir Soudan (comme LIEON l'avait indiqué). Ces bâtonnets de HEIDENHAIN ont été visibles dans tous les segments du néphron où ils se trouvent, c'est à dire dans le tube contourné, la branche large de l'anse de HENLE et la pièce intermédiaire.

Nous n'avons eu à notre disposition que quelques fragments de rein de chien, qui avaient été fixés pendant plusieurs mois dans le formol. Nous n'avons pas retrouvé les inclusions lipidiques observées dans les cellules (J. VERNE), mais ceci n'était certainement dû à une solubilisation lors de l'imprégnation et de l'inclusion par le polyéthylène glycol, car sur les coupes à congélation témoins des mêmes fragments, nous n'avons pu mettre en évidence ces lipides. Il est probable que ces graisses avaient perdu leurs caractères soudanophiles au cours de cette longue fixation (J. VERNE).

B - Les coupes de surrénale ont été effectuées à diverses épaisseurs depuis 2,5 jusqu'à 7,5 microns. Nous avons pratiqué également sur les mêmes blocs des coupes plus épaisses (10 à 15 microns) afin d'obtenir des images topographiques plus contrastées, comparables aux coupes à congélation, mais ceci s'est réalisé au prix de cassures dans ces coupes. Pour obtenir des sections épaisses et parfaites, il aurait fallu faire des inclusions dans le polyéthylène glycol 1500, mais ceci n'aurait plus permis les coupes minces. Il est évident que sur un bloc déterminé, la latitude d'épaisseur des coupes est réduite, exactement comme pour les

blocs à la paraffine.

En plus des colorations ordinaires, nous avons effectué des colorations au bleu de toluidine à pH contrôlé (de pH 3 à pH 5) pour étudier l'ergastoplasme, et des colorations au Soudan pour les lipides.

1) les méthodes au bleu de toluidine ont donné une coloration très précise des noyaux et parfaitement mise en évidence la basophilie cytoplasmique, qui décroît depuis la zone glomérulaire jusqu'à la fasciculée, avec dans cette zone, des différences individuelles entre les cellules.

Contre la capsule de l'organe, le conjonctif renfermait des mastzellen périvasculaires. Les granulations de ces cellules sur les coupes montées dans le colorant dilué à pH 3, étaient caractérisées par une métachromasie intense, tranchant sur le bleu des noyaux et des formations ergastoplasmiques. Les unes étalées apparaissaient rouge vif, les autres contractées, globuleuses, épaisses, étaient plus foncées.

2) la méthode au Noir Soudan montre que les lipides intracytoplasmiques persistent dans les cellules de la cortico-surrénale. Sur les coupes épaisses, on obtient la même répartition topographique après inclusion dans le Polyéthylène glycol, qu'avec les coupes à congélation, la fasciculée étant la plus colorée.

Sur les coupes fines à 2,5 microns, les cellules de la zone fasciculée qui n'ont pas subi de rétraction, apparaissent particulièrement volumineuses. Leur noyau, qui n'a pas fixé le Soudan, constitue une vésicule qui tranche par son aspect clair

sur le cytoplasme teinté du gris au noir.

Ce cytoplasme est d'aspect variable suivant les cellules. Les unes ont un cytoplasme qui paraît presque totalement soudanophile à l'exception de fines inclusions sphériques réfringentes. A l'immersion cette soudanophilie paraît porter sur de très fins granules. Les autres, renferment de grosses granulations arrondies prenant beaucoup plus faiblement le Soudan, ce qui leur confère un aspect clair. Dans certains de ces éléments apparaissent d'autres inclusions comportant une croutelle totalement noire, entourant complètement ou partiellement un centre beaucoup plus pâle. Ces éléments sont en nombre variable, parfois uniques, parfois multiples, disposés plus ou moins en couronne autour du noyau.

A noter que des cellules adipeuses, dans le tissu péri-capsulaire, ont été coupées. Elles sont intensément colorées en noir, mais elles ont subi une dislocation lors de la confection des coupes (comme d'ailleurs sur les coupes à congélation). Dans les blocs, ces cellules sont enrobées de Polyéthylène glycol et non véritablement incluses, étant donné la grosseur de leur enclave lipidique qui ne se laisse pas pénétrer par le Polyéthylène glycol. Il n'en était pas de même pour les cellules de la cortico-surrénale, où le réseau de cytoplasme séparant les liposomes se laisse impregner par le produit. Il est cependant à remarquer que les cellules de la zone fasciculée, si elles ne sont pas rétractées, sont parfois légèrement disloquées par le rasoir. Il semble que l'inclusion des surrénales soit moins bonne que celle des reins.

CONCLUSIONS

Les inclusions dans le Polyéthylène glycol s'adaptent parfaitement à la technique histologique.

La technique d'inclusion doit être rigoureuse pour permettre des coupes correctes. Elle nécessite une "deshydratation" préalable des tissus par un Polyéthylène glycol liquide de faible poids moléculaire.

Le milieu servant à l'impregnation des tissus et à l'inclusion est un mélange fondu à l'étuve de Polyéthylène glycol 1500 et 4000, dont la proportion varie suivant le but qu'on se propose: plus la quantité de Polyéthylène glycol 1500 est élevée, plus le bloc est tendre et les coupes que l'on peut faire, épaisses.

La confection des rubans est très aisée, mais l'étalement et le collage des coupes, difficiles, assez voisins des coupes à congélation. Les multiples méthodes proposées par les auteurs sont équivalentes, le "tour de main" étant plus important que la formule du liquide d'étalement et de collage.

Ces difficultés d'étalement des coupes sont le grand désavantage de cette technique, qui de ce fait, ne saurait supplanter en routine, celle à la paraffine.

Les colorations histologiques usuelles et les colorations des graisses s'effectuent facilement.

L'avantage par rapport aux coupes à la paraffine consiste en une moindre rétraction et surtout en une conservation des lipides (et par là, semble-t-il, du chondriome).

L'avantage par rapport à la méthode à la congélation, réside dans la finesse des coupes, qui atteignent 2,5 microns sans la moindre difficulté.

Vu,

Le Président de Thèse:

Professeur J. VERNE

Vu,

Le Doyen de la Faculté:

Professeur L. BINET

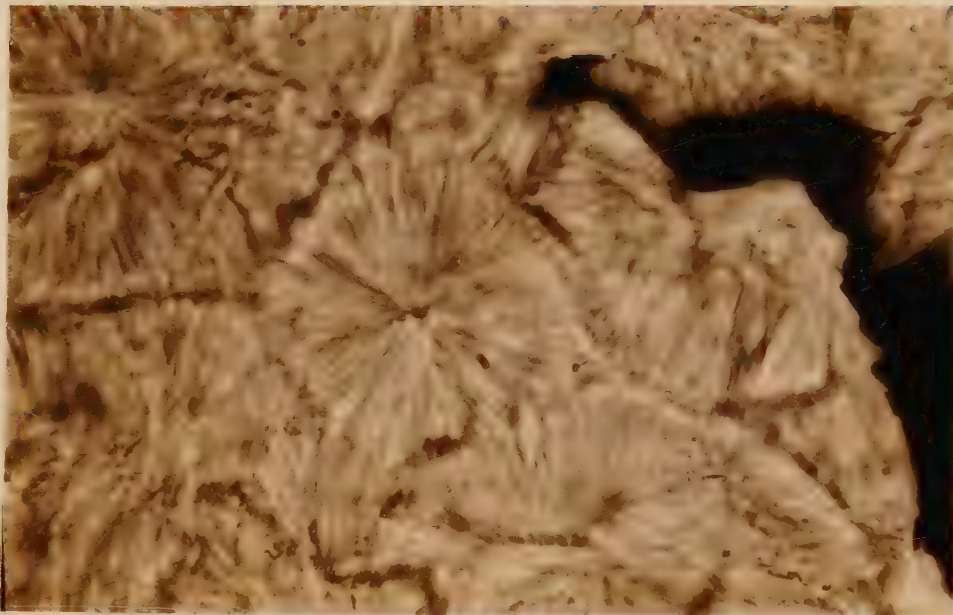
Vu et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris:

J. SARRAILH



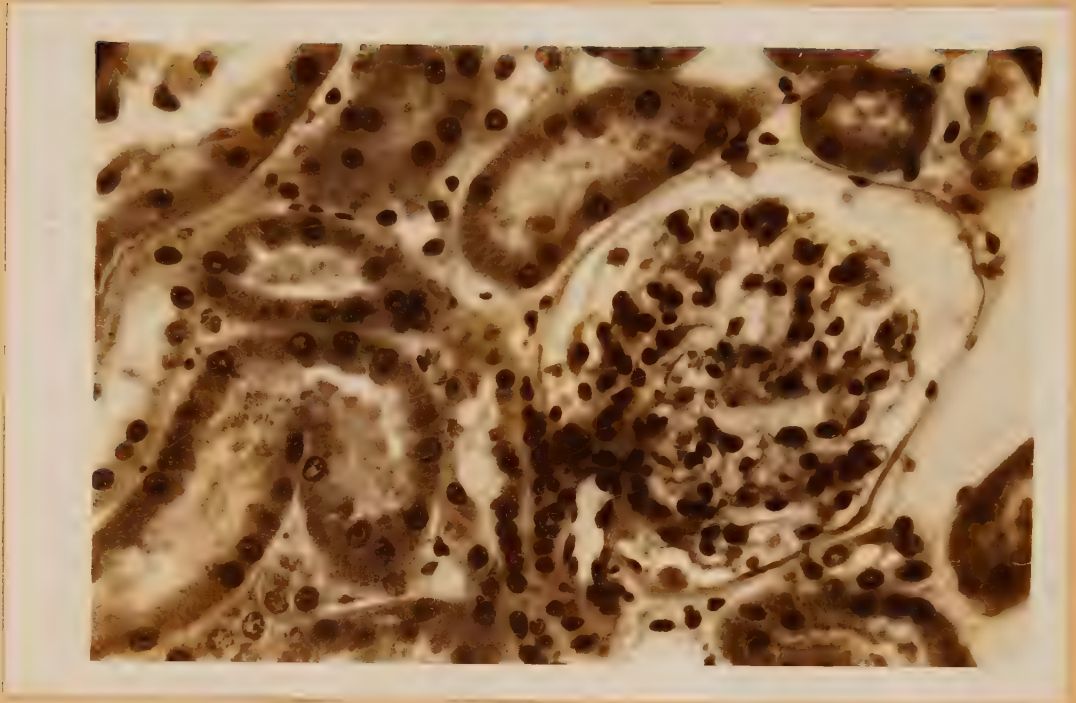
Les coupes sont faites avec un microtome du type Minot. Elles se font sans aucune difficulté quand les pièces histologiques sont parfaitement imprégnées par le Polyéthylène glycol. On obtient des rubans tels que celui que nous voyons sur la photo ci-dessus.



Cristaux de Polyéthylène Glycol 4000 examinés en lumière ordinaire entre lame et lamelle.

Oculaire: 6 x. Objectif: 40 x.

On voit les cristaux avec les très fines lignes où ils se réunissent les uns aux autres. Dans le coin droit, la surface noire représente une cassure qui s'est produite lors du refroidissement. Elle explique le manque de cohésion des blocs de Polyéthylène glycol 4000. De telles images de "cassures" ne s'observent pas dans le Polyéthylène 1500.

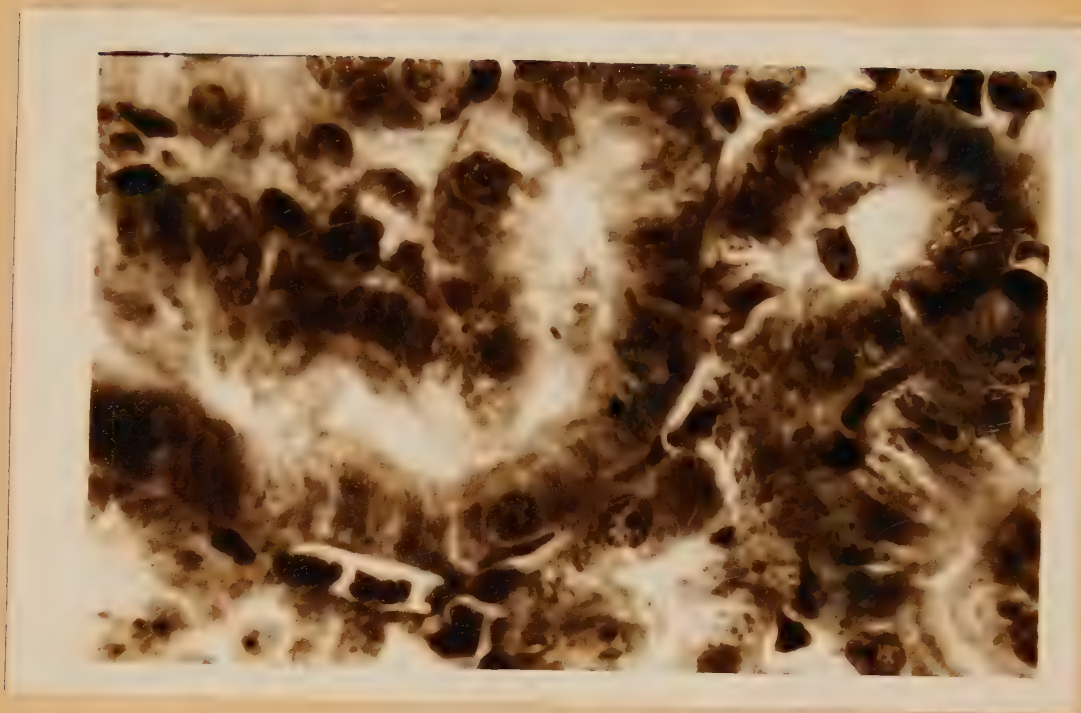


Rein de chien.-

Oculaire: 6 x. Objectif: 40 x.

Hématéine - Erythrosine - safran.

Le glomérule et son pôle vasculaire sont visibles.
Noter le peu de rétraction.



Rein de souris.

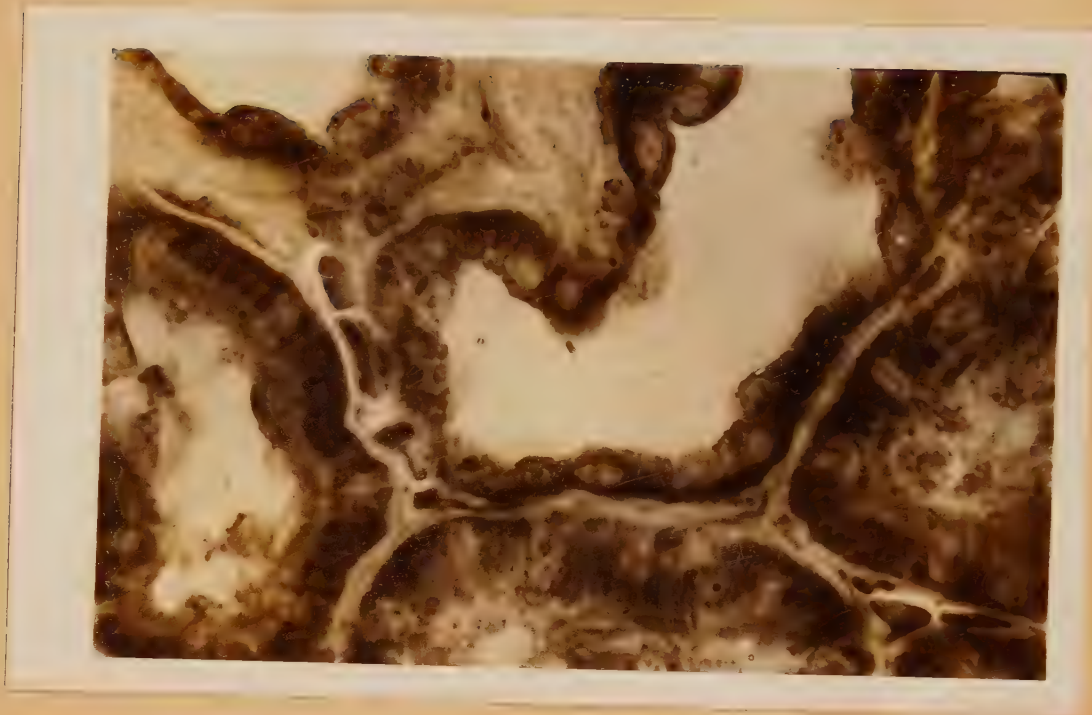
Oculaire: 6 x. Objectif: 100 x.

Trichrome.

Tubes contournés.

Les batonnets de Heindenhain, la bordure en brosse, sont visibles.

Noter des enclaves colorées par la Fucshine.

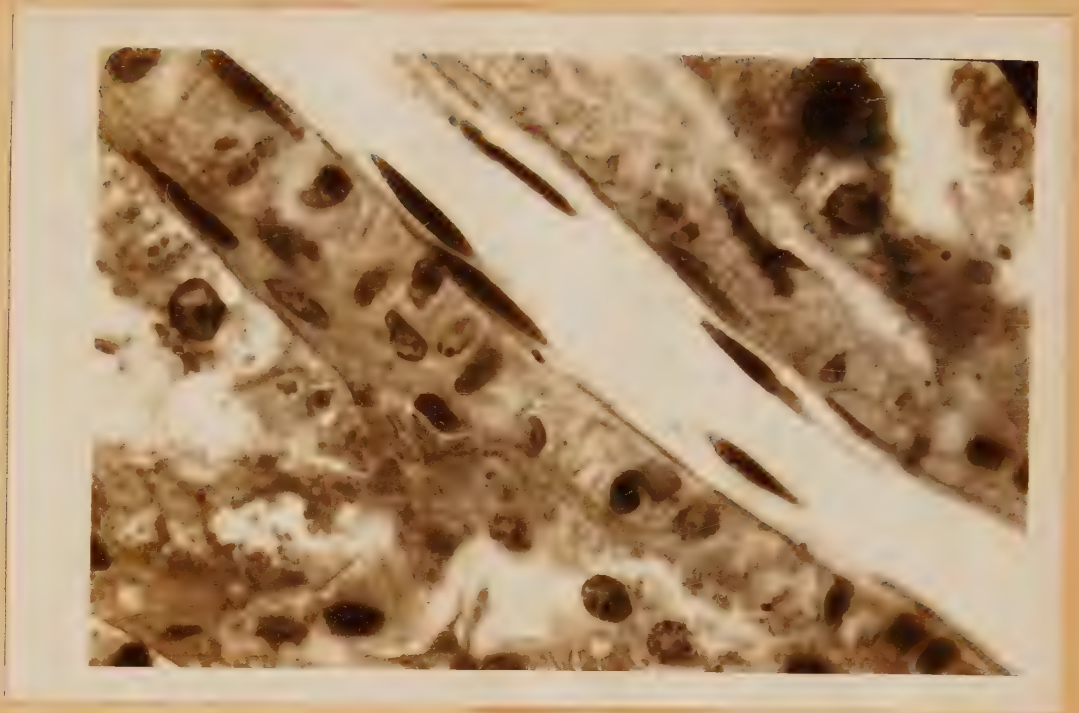


Rein de souris. (préparation provenant du même bloc que la photo précédente)

Oculaire: 6 x. Objectif: 100 x.

Coloration par le noir Soudan; montage dans la gélatine glycérinée.

Les batonnets de Heindenhain sont visibles tant dans les tubes contournés que dans les pièces intermédiaires.



Rein de chien.

Oculaire: 6x. Objectif: 100 x.

Hématéine - Erythrosine - Safran.

Artériole interlobulaire, coupée en long.

Les cellules endothéliales sont bien visibles ainsi que leur cytoplasme.

Voir les batonnets de Heindenhain dans les tubes contournés.



Surrénale de souris.

Oculaire: 6 x. Objectif: 40 x.

Noir Soudan. Montage dans la gélatine glycérinée.

Sous la capsule, la zone glomérulaire est moins riche en lipides que la zone fasciculée.

Il s'agit d'une coupe épaisse 15 microns, faite dans un bloc de Nycoline 1500: 80 % et de Nycoline 4000: 20 %.

Les blocs de ce mélange se prêtent mal aux coupes épaisses ainsi qu'en témoigne la mise au point difficile, car il s'est produit des fragmentations et des fissures dans la coupe.



Surrénale de souris.

Oculaire: 6 x. Objectif: 100 x.

Coupe à 2,5 microns. Noir Soudan.

En clair, 1 es noyaux.

Voir une grosse cellule binuclée, renfermant des grains volumineux et pâles, sauf quelques enclaves fortement soudanophiles. Autour les autres cellules ont un cytoplasme très finement granuleux, ayant des affinités beaucoup plus marquées pour le noir Soudan. A noter dans certaines cellules des enclaves d'assez grande taille comportant un centre clair et une croutelle périphérique fortement Soudanophile.



Surrénale de souris.

Oculaire: 6 x. Objectif: 40 x.

Bleu de Toluidine à pH 3, montée au baume du Canada.

Forte basophilie de la zone glomérulaire. En dehors de la capsule quelques mastzellen plus ou moins étalées.

B I B L I O G R A P H I E

- ARMSTRONG (J.), RICHARDSON (K.C) and YOUNG (J.Z) - Staining neural and feet and mitochondria after postchroming and Carbowax embedding. Stain Technol. U.S.A (1956), 31, n°6; 263-70.
- ARMSTRONG (J.), STEPHENS (P.R) - A modified chrome silver paraffine wax technique for staining neural and feet. Stain technol. U.S.A (1960), 35; 71/75.
- BLANK (H.) - A rapid embedding method for histological sections employing a water soluble-wax - J. Invest. Dermatol (1949), 12 95-99.
- BLANK (H.), MC CARTHY (P.L) - A general method for preparing histologic sections with a water soluble-wax. J. Lab. and cl in. Med. (1950), 36; 776-81.
- BLANK (H.), Mc CARTHY (P.L), DELAMATER (E.) - A non-vacuum freezing deshydrating technic for histology, autoradiography and microbiol cytology. Stain technol. U.S.A (1951), 26, n°3 193-97.
- CANIVENC et MAYER - In DUBREUIL (E.) et BAUDRIMONT - Manuel théorique et pratique d'histologie (1950).
- CARSTEN (M.E) - A rapid procedure of the embedding of eyes. Arch. Path.(1947), 44; 96-100.
- CHARLES (P.CARPENTER and C.BOYD CHAFFER - J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.(1952) vol. XL1, n°1.
- CUTLER, ORAN (I.) - Embedding in gl col stearate. Arch. Path. (1935), 20; 445-46.

- FIRMINER (H.I) - Carbowax embedding for obtaining thin tissue sections and study of intra cellular lipids. Stain technol. U.S.A (1950), 25; 121-23.
- FIRMINER (H.I) - Ultra-violet absorption spectromicroscopy of interstitial cells of testis using Carbowax embedding. J. nat. Cancer Inst. (1950), 10; 1350-52.
- FREDRICSSON (B.) - Preservation of the activities of alkaline phosphatase and naphthyl acetate splitting esterase during freeze-drying, embedding in Polyethylene glycol, and post fixation. Acta. Histochem. Allem. (1958), 6, n° 1-4; 165-73.
- GOLAND (P.), JASON (R.S) and BERRY (K.) - Combined Carbowax-paraffine technic for micro sectionning of fixed tissues. Stain Technol. U.S.A (1954), 29, n°1; 7-8.
- GIOVACCHINI (R.P) - Affixing carbowax sections to slides for routine staining. Stain Technol U.S.A (1958), 33, n°5; 247-48.
- HALE (A.J) - The effects of temperature and of the relative humidity on sectionning of tissues embedded in polyethylene-wax. Stain Technol. U.S.A (1952), 27, n°2; 189-192.
- HALLE (W.) - Die Verwendung von wasserlöslichen Polywachsen als Einbettungsmittel und histologischen Technik. Mikrokosmos, Dtsch. (1959), 48, n°9; 275-76.
- HALLE (W.) - Histochemischer Nachweis von Glykogen und Lipoiden nach Einbettung in "Oxyd wachs". Z. Wissench. Mikr. Dtsch. (1959), 64, n°3; 165-73.
- HENRY F.SMYTH,Jr, CHARLES P.CARPENTER, and CARROL S.WEIL - The Toxicology of the Polyethylene Glycols - J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. (1950) vol.34, n°6; 349-354.

- HENRY F.SMYTH Jr, CHARLES P.CARPENTER, and CARROL S.WEIL -
The Chronic Oral Toxicology of the Polyethylene Glycols. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. (1955) vol 44, n°1; 27-30.
- JONES (R.M), THOMAS (W.A), O'NEAL (R.M) - Embedding of tissues in Carbowax. Amer. Jour. Clin. Path. (1959), 31, n°5; 453-56.
- LANGERON - Precis de microscopie, Paris 1949.
- LINSKENS - Schnelleinbettung mit Aquaffin unter Umgehung der Alkoholstufen. Mikrokosmos (1956), 43; 237-38.
- Mc CORMICK (J.B) - Improved tissues embedding method for paraffin and carbowax, using tissue-tek system. Amer. J. Clin. Pathol. (1959), 31, n° 2, 195-96.
- Mc LANE (S.R) - Higher Polyethylene glycols as water soluble matrix for sectioning fresh and fixed plant tissues. Stain Technol. (1951), 26; 63-64.
- MANELY (R.B) - A note on the value of Nonex as an embedding medium in the invertebrate histology. Ann. Trop. Med. Parasitol. G.B. (1956), 50, n°1; 101-102.
- MASSON (P.) - Tumeurs humaines (Chapitre de technique) 1956 Paris.
- MILES (A.E.W) and LINDER (J.E) - Polyethylene glycols as histological embedding media. Note on the dimensional change of tissue during embedding in various media. J. Royal Microscopical Society (1952), 72; 199-213.
- NAPHTACHIMIE - Polyéthylène glycols - Renseignements technico-commerciaux. Notice T.C 3025.
- ORTON (S.T) and POST (J.) - Some experiments with a new embedding material. Bull. Neur. Inst. New York (1932), 2; 302.

- NADKARNI (M.V), MEYERS (D.B) and ZOPF (L.C) - The effects of surface active agents on the crystallinity of "carbowax" compounds. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. (1949), " ; 216-21.
- POLICARD (A.), BESSIS (M.), LOCQUIN (M.) - Traité de microscopie 1957 Paris.
- RINEHART (J.F) and ABUL HAJ (S.K) - Histological demonstration of lipids in tissue after deshydratation and embedding in a Polyethylen glycol. A.M.A. Arch. Path. (1951), 51; 666-69.
- ROUVILLE (E.de) - Technique microscopique (d'après BOEHM et OPPEL) Paris 1913.
- SANDRITTER (W.), KIRSTEN (W.) - Ueber eine Einbettungsmethode mit wasserlöslichen Polyäthylenglykolen (Polywachs). Zbl. Allg. Path. Anat. Dtsch. (1954), 92, n°10-11; 420-24.
- VAN HORNE (R.L), ZOPF (L.L) - Water soluble embedding material for botanical microtechnique. J. Am. Pharm. Assoc. (1951), 9, n° 1; 31-34.
- VERNE (J.) - La formation de composés aldéhydiques au dépens des lipides dans les glances surrénales. Archiv. Anat. Micr. (1929), 137.
- VERNE (J.) et HEBERT (S.) - Les types lipidiques de la cortico-surrénale chez les mammifères. Ann. Endocrine (1951); 192.
- VERNE (J.) - Précis d'histologie (1961) Paris
- WADE (H.W) - Notes on the Carbowax method of making tissue sections. Stain Technol. U.S.A (1952), 27, n°2; 71-79.
- WALTER (F.) - Einbettungsmittel für die Herstellung von dünnsten mikrotomschnitten. Mikrokosmos (1953), 43; 118-119.

- WYCKOFF (R.W.G) and YOUNG (J.Z) - The motoneuron surface.
Pro. Roy. Soc. Bull. (1956) 144; 440-450.
- YOS (D.A) - The mounting of carbowax sections with lighter-fluid and rubber cement. Stain Technol. U.S.A (1961) 36; 163-67.
- YOUNG (J.Z) - Synapses in the spinal cord. Progress in Neurobiology, edited by J. ARIEN KAPPERS, Amsterdam 1956 p. 83-86.
- ZUBIGE (F.T), KOPACZYK (K.C), CAPE (W.E), LAST (J.H) - A new Carbowax method for routinely performing lipid, hematoxylin and eosin and elastic staining technics on adjacent freeze-dried for formalin fixed sections. J. Histochem. and Cytochem. U.S.A (1958), 6, n°2; 133-138.
- ZUBIGE (F.T), FINK (M.L), BROWN (K.D) - Carbowax 400: a new solvent for oil-red O and Sudan IV for staining carbowax embedded and frozen sections. Stain Technol. U.S.A (1959), 34, n°1; 73-77.

